Zur Analytik gebräuchlicher Antihypertonika

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Wessinger
aus Bilfingen

1979

Zur Analytik gebräuchlicher Antihypertonika

Dissertation
zur
Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Wessinger
aus Bilfingen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 13. Juli 1979

Dekan: Professor Dr. M. Hanack

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Auterhoff
2. Berichterstatter: Professor Dr. K.-A. Kovar

Die vorliegende Arbeit wurde im November 1977
unter Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff
am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen
begonnen und im Mai 1979 abgeschlossen.

Meinem verehrten Lehrer
Herrn Professor Dr. H. Auterhoff
danke ich für die Anregungen und
die freundliche Unterstützung bei
dieser Arbeit.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

I. E i n l e i t u n g 1

II. Isolierung der Substanzen aus Fertigarzneimitteln 4

III. Physikalische Konstanten der Antihypertonika 12

IV. Identitätsnachweise der Antihypertonika 12

1. Dünnschichtchromatographie 12

2. Farbreaktionen 15

a) Reaktionen der Antihypertonika auf der DC-Platte mit verschiedenen Sprühreagenzien 15

b) Reaktionen der Antihypertonika in Lösung .. 18

c) Spezielle Nachweisreaktionen für einzelne Substanzen 23

3. UV-Spektroskopie 27

V. Trennung von Substanzgemischen nach Stas-Otto 32

VI. Zur Analytik von Methyldopa 36

1. Oxidation von Methyldopa zu einem roten Farbprodukt 36

a) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der roten Farbstofflösung 39

b) Versuche zur Isolierung des roten Farbproduktes 40

c) Elektronenspektroskopische Untersuchung ... 42

d) Reduktion und Acetylierung des Farbproduktes 44

e) Semicarbazonbildung des roten Farbproduktes 54

f) Dinitrophenylhydrazonbildung des roten Farbproduktes 59

g) Umsetzung mit o-Phenylendiamin 59

2. Zur Reaktion von Methyldopa mit salpetriger Säure 63

3. Zur Reaktion mit Nitrobenzoylchlorid 66

VII. Zur Analytik von Chlortalidon 68

1. Gelbfärbung in konz. Schwefelsäure 68

a) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionslösung 69

b) Isolierung und Identifizierung des H_2SO_4-Abbauproduktes 72

c) Diskussion zur Entstehung der Gelbfärbung in konz. Schwefelsäure 80

2. Violettfärbung des Benzophenoncarbonsäurederivates mit α-Naphthol in konz. Schwefelsäure 82

a) UV-Spektroskopische Untersuchung des Reaktionsansatzes 83

b) Isolierung eines Produktes der Farbstofflösung 84

c) Spektroskopische Untersuchung des isolierten Produktes 86

d) Zum Reaktionsmechanismus und zur Spezifität der Reaktion 91

VIII. Zur Analytik von Clonidin 94

1. Erhitzen mit konz. NaOH-Lösung bis zur Blaufärbung 95

2. NaOH-Schmelze und Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure 97

IX. Zusammenfassung 98

X. Beschreibung der Versuche 105

I. Einleitung

Zur Behandlung der Hypertonie werden heute insbesondere Reserpin, Dihydralazin, Guanethidin, Methyldopa, Clonidin, Vertreter aus der Stoffklasse der Diuretika und Beta-Rezeptorenblocker therapeutisch eingesetzt. Neben der Monotherapie mit einer dieser Substanzen spielt bei der antihypertensiven Blutdruckbehandlung der Einsatz von Kombinationspräparaten eine bedeutende Rolle. Aufgrund der verschiedenen Wirkungsmechanismen der Einzelkomponenten (Tab. 1) wird in die Blutdruckregulation an verschiedenen Punkten eingegriffen und es kommt zu potenzierten Effekten. Dies rechtfertigt theoretisch die auch in der Praxis recht erfolgreiche Therapie der Hypertonie mit Kombinationspräparaten, so problematisch Kombinationspräparate bei vielen anderen Krankheiten auch sind.

Sucht man in der einschlägigen Literatur nach Angaben zur Analytik der antihypertensiv eingesetzten Substanzen, so findet man nur für Reserpin [1], Dihydralazin [2] und einige Diuretika wie Chlorothiazid [3], Hydrochlorothiazid [3] und Furosemid [4] eventuell ausreichende Angaben. Angaben darüber, wie man die in den Kombinationspräparaten vorliegenden Substanzgemische trennen und die einzelnen Komponenten identifizieren kann, fehlen ganz.

---

1) Ph. Eur. III, S. 237; DAB 7, S. 1299.

2) 2 AB DDR.

3) Brit. 73.

4) Ph. Eur. III, S. 113.

Tab. 1: Wirkungsmechanismen der Antihypertonika *

Reserpin	- hemmt Sympathicusaktivität peripher und zentral; senkt peripheren Gefäßwiderstand durch Verarmung an Noradrenalin-Granula.
Dihydralazin	- greift an der glatten Muskulatur an und hat damit einen direkten vasodilatatorischen Effekt.
Guanethidin	- hemmt die Übertragung der postganglionären sympathischen Erregung auf das Erfolgsorgan; reduziert damit Gefäßwiderstand und Herzfrequenz.
Methyldopa	- wirkt auf das Zentralnervensystem; wird metabolisiert zu L-α-Methylnoradrenalin (falscher Neurotransmitter).
Clonidin	- stimuliert zentrale Alpha-Rezeptoren, die auf den Sympathicustonus inhibierend wirken.
Beta-Rezeptorenblocker	- greifen zentral an; hemmen die Reninfreisetzung ** im juxtaglomerulären Apparat.
Diuretika	- forcieren renale Natrium- und Wasserausscheidung, senken damit die Reaktion der Gefäßmuskulatur auf vasokonstriktorische Reize.

---

* Nach:
- M. Wilhelm, G. de Stevens: Antihypertensive Agents, in: Progress in Drug Research. E. Jucker (Hrsg.). Birkhäuser Verlag. Basel, Stuttgart 1976.
- P.A. van Zwieten: Antihypertensive Drugs with a Central Action, in: Progress in Pharmacology Vol. 1, Nr. 1 (1975), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

** Renin bildet aus Angiotensinogen Angiotensin, das zu einer Blutdruckerhöhung führt.

Diese Arbeit versucht deshalb

a) spezifische Identitätsreaktionen für die einzelnen Substanzen oder Substanzgruppen zu finden,
b) einfache Möglichkeiten der Trennung von Substanzgemischen und Identifizierung der Einzelkomponenten aufzuzeigen, und
c) einige Farbreaktionen, beispielsweise von Methyldopa, Chlortalidon und Clonidin, die analytisch genutzt werden können, näher zu charakterisieren.

II. Isolierung der Substanzen aus Fertigarzneimitteln

Berücksichtigt werden hier 21 Einzelsubstanzen, 6 basisch reagierende, 15 neutral bzw. sauer reagierende. Sie stehen stellvertretend für eine größere Zahl verwendeter Substanzen, sie repräsentieren aber mit Ausnahme der Beta-Rezeptorenblocker alle antihypertensiv eingesetzten Substanztypen.

Die basisch reagierenden Substanzen Guanethidin, Clonidin, Tolazolin und Dihydralazin können aus den Tabletten nach Alkalisieren mit Natronlauge und Extrahieren mit Ether isoliert werden. Reserpin wird am besten aus einer wässrigen Aufschlämmung der Tablettenzubereitung mit Chloroform, Triamteren mit n-Butanol ausgeschüttelt.

Spironolacton kann direkt aus der zerkleinerten Tablettenzubereitung mit Chloroform isoliert werden.

Methyldopa läßt sich aus einem wässrigen Extrakt durch Einstellen des isoelektrischen Punktes (pH 4 - 5) ausfällen.

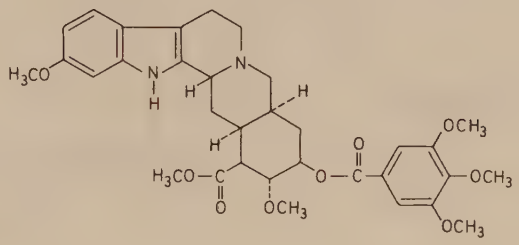
Die Diuretika (Thiadiazin-, Dihydrothiadiazin- und Chlorbenzolsulfonamidderivate) können aus den Fertigarzneimitteln mit Aceton extrahiert werden.

Die Trennung der Substanzen aus Kombinationspräparaten wird in Kapitel V beschrieben.

Tab. 2: Antihypertonika *
(gegliedert nach chemischen Gesichtspunkten)

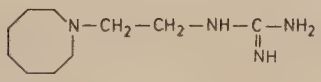
a) Alkaloide

Reserpin

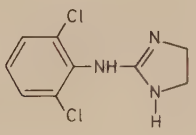


b) Basisch reagierende synthetisch hergestellte Substanzen

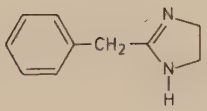
Guanethidin



Clonidin



Tolazolin



---

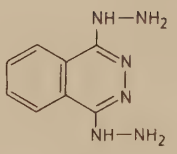
* Lit. S. Ebel: Handbuch der Arzneimittelanalytik. Verlag Chemie. Weinheim, New York 1977.

G. Ehrhart, H. Ruschig (Hrsg.): Arzneimittel. Entwicklung, Wirkung, Darstellung. 2. Aufl. Verlag Chemie. Weinheim, New York 1972.

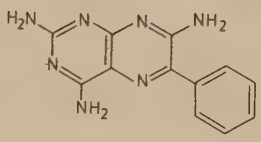
Pharmazeutische Stoffliste.
Index Nominum 1977/78.

Tab. 2: Antihypertonika

Dihydralazin

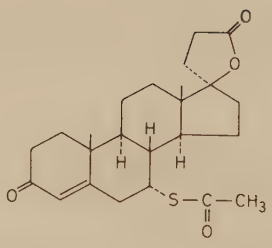


Triamteren



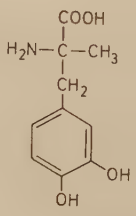
c) Neutralstoffe

Spironolacton



d) Sauer reagierende Substanzen

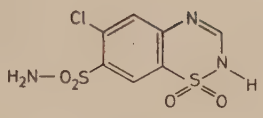
L-α-Methyldopa



Tab. 2: Antihypertonika

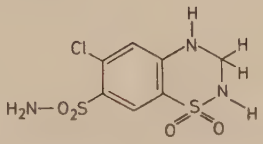
Thiadiazinderivate

Chlorothiazid

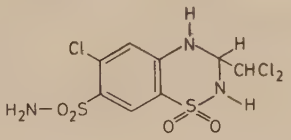


Dihydrothiadiazinderivate

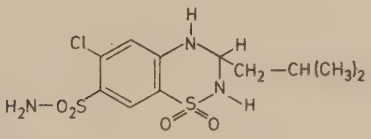
Hydrochlorothiazid



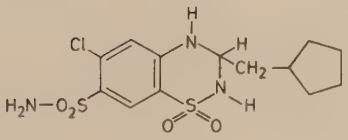
Trichlormethiazid



Buthiazid

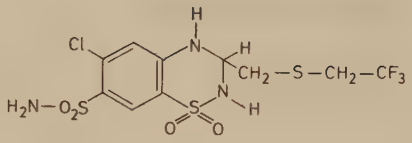


Cyclopenthiazid

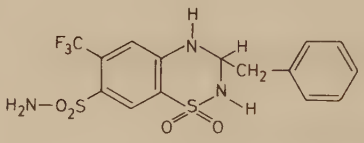


Tab. 2: Antihypertonika

Polythiazid

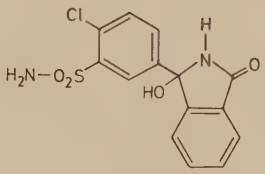


Bendroflumethiazid

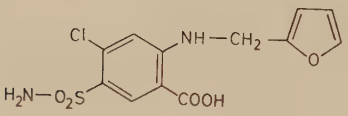


Chlorbenzolsulfonamidderivate

Chlortalidon

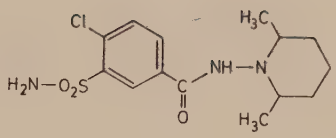


Furosemid

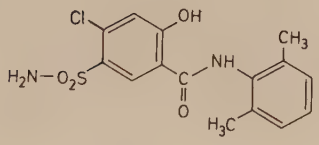


Tab. 2: Antihypertonika

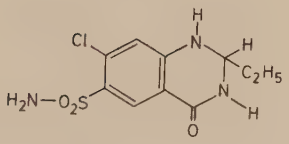
Clopamid



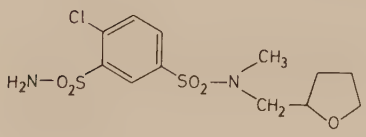
Xipamid



Quinethazon



Mefrusid



Tab. 3: Physikalische Konstanten

Basisch reagierende Stoffe

Substanz	Summenformel	Molekülmasse Salz	Molekülmasse Base	Schmelzpunkt °C Salz	Schmelzpunkt °C Base
Reserpin	$C_{33} H_{40} N_2 O_9$		608,7		262 - 263 (Z)
Guanethidin	$C_{10} H_{22} N_4$	* 296,4	198,3	* 250 - 252	ölig
Clonidin	$C_9 H_9 Cl_2 N_3$	**266,6	230,1	**314 - 316 (Z)	130 - 133
Tolazolin	$C_{10} H_{12} N_2$	**196,7	160,2	**174 - 175	58 - 60
Dihydralazin	$C_{10} H_{22} N_4$	* 288,3	190,2	* 241 - 242	unbeständig
Triamteren	$C_{12} H_{11} N_7$		253,3		330

Neutralstoffe und sauer reagierende Stoffe

Substanz	Summenformel	Molekülmasse	Schmelzpunkt °C
Spironolacton	$C_{24} H_{32} O_4 S$	416,6	204 - 206
Methyldopa	$C_{10} H_{13} N O_4$	211,2	305 (Z)
Chlorothiazid	$C_7 H_6 Cl N_3 O_4 S_2$	295,7	350 (Z)
Hydrochlorothiazid	$C_7 H_8 Cl N_3 O_4 S_2$	297,7	272
Trichlormethiazid	$C_8 H_8 Cl_3 N_3 O_4 S_2$	380,7	263 - 265 (Z)
Buthiazid	$C_{11} H_{16} Cl N_3 O_4 S_2$	353,9	230 - 233
Cyclopenthiazid	$C_{13} H_{18} Cl N_3 O_4 S_2$	379,9	238 - 239 (Z)
Polythiazid	$C_{11} H_{13} Cl F_3 N_3 O_4 S_2$	439,9	215 - 216
Bendroflumethiazid	$C_{15} H_{14} F_3 N_3 O_4 S_2$	421,4	218 - 220
Chlortalidon	$C_{14} H_{11} Cl N_2 O_4 S$	338,8	223 - 224 (Z)
Furosemid	$C_{12} H_{11} Cl N_2 O_5 S$	330,8	214 - 216
Clopamid	$C_{14} H_{20} Cl N_3 O_3 S$	345,9	248 - 250
Xipamid	$C_{15} H_{15} Cl N_2 O_4 S$	354,8	244 - 246
Quinethazon	$C_{10} H_{12} Cl N_3 O_3 S$	289,8	253 - 255
Mefrusid	$C_{13} H_{19} Cl N_2 O_5 S_2$	382,9	148 - 150

* = Salz der Schwefelsäure
** = Salz der Salzsäure

Tab. 4: Löslichkeit der Antihypertonika

Basisch reagierende Stoffe

Substanz	Wasser	Methanol	Ethanol	Aceton	Ether	Chloroform
Reserpin	-	-	-	1 : 1000	-	1 : 30
Guanethidin	-	1 : 260	1 : 580	-	1 : 600	-
Guanethidinsulfat	1 : 10	-	-	-	-	-
Clonidin	-	1 : 30	1 : 40	1 : 10	1 : 50	1 : 20
Clonidinhydrochlorid	1 : 30	1 : 15	1 : 760	-	-	-
Tolazolin	-	1 : 30	1 : 70	1 : 30	1 : 80	1 : 10
Tolazolinhydrochlorid	1 : 8	1 : 10	1 : 150	-	-	-
Dihydralazin *						
Dihydralazin-Sulfat	1 : 700	-	-	-	-	-
Triamteren	-	-	-	-	-	-

Neutralstoffe und sauer reagierende Stoffe

Substanz	Wasser	Methanol	Ethanol	Aceton	Ether	Chloroform
Spironolacton	-	1 : 500	-	1 : 30	1 : 500	1 : 20
Methyldopa	1 : 360	1 : 280	-	-	-	-
Chlorothiazid	-	-	-	1 : 500	-	-
Hydrochlorothiazid	-	1 : 910	-	1 : 240	-	-
Trichlormethiazid	-	1 : 280	-	1 : 70	-	-
Buthiazid	-	1 : 200	1 : 1000	1 : 30	-	-
Cyclopenthiazid	-	1 : 60	1 : 250	1 : 40	-	-
Polythiazid	-	1 : 30	1 : 110	1 : 10	1 : 700	-
Bendroflumethiazid	-	1 : 50	1 : 320	1 : 20	-	-
Chlortalidon	-	1 : 870	1 : 300	1 : 800	-	-
Furosemid	-	1 : 130	1 : 510	1 : 50	-	-
Clopamid	-	1 : 95	1 : 600	1 : 250	-	-
Xipamid	-	1 : 35	1 : 90	1 : 10	1 : 200	-
Quinethazon	-	1 : 920	-	1 : 810	-	-
Mefrusid	-	1 : 750	1 : 480	1 : 30	1 : 900	1 : 70

- = unlöslich, das heißt Löslichkeit ist größer als 1 : 1000.

* = wurde nicht bestimmt, da nur geringe Mengen Base zur Verfügung standen.

Unterschiede im Vergleich zu Löslichkeitsangaben in der Literatur sind methodisch (s.S. 108) bedingt.

III. Physikalische Konstanten der Antihypertonika

Molekülmasse, Schmelzpunkt sowie die Löslichkeit der Substanzen sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

IV. Identitätsnachweise der Antihypertonika

1. Dünnschichtchromatographie

a) Basisch reagierende Stoffe (Abb. 1)

Die Basen der Substanzen von Tabelle 2a und b wurden in Chloroform bzw. Triamteren in Butanol gelöst und auf Kieselgel F_{254} 'Merck'-Platten aufgetragen. Als Fließmittel wurde Chloroform/Methanol/NH_3 verwendet. Die Laufhöhe betrug 15 cm. Die Detektion erfolgte im UV-Licht. Guanethidin löscht die Fluoreszenz der Platte jedoch nicht, es muß mit Dragendorff-Reagens oder mit der Reaktion nach Sakaguchi auf der Platte sichtbar gemacht werden.

b) Neutralstoffe und sauer reagierende Stoffe (Abb. 2)

Die in einem geeigneten Lösungsmittel (Tab. 4) gelösten Substanzen wurden auf Kieselgel F_{254} 'Merck'-Platten aufgetragen. Die Platten wurden doppelt entwickelt. Als Fließmittel Nr. 1 diente Chloroform/Methanol/NH_3, als Fließmittel Nr. 2 wassergesättigter Essigsäureethylester. Die Detektion erfolgte im UV-Licht oder mit Ehrlich Reagens nach kurzem Erhitzen.

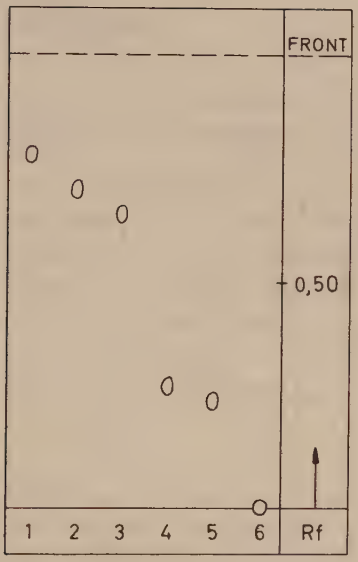


Abb. 1: Schematisches Dünnschichtchromatogramm der basischen Antihypertonika

1 Reserpin
2 Dihydralazin
3 Clonidin
4 Triamteren
5 Tolazolin
6 Guanethidin

Adsorbens: Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel: Chloroform/Methanol/NH_3 (25 %) 80 + 14 + 1
Laufhöhe: 15 cm
Detektion: 1. UV-Licht
2. Dragendorff-Reagens

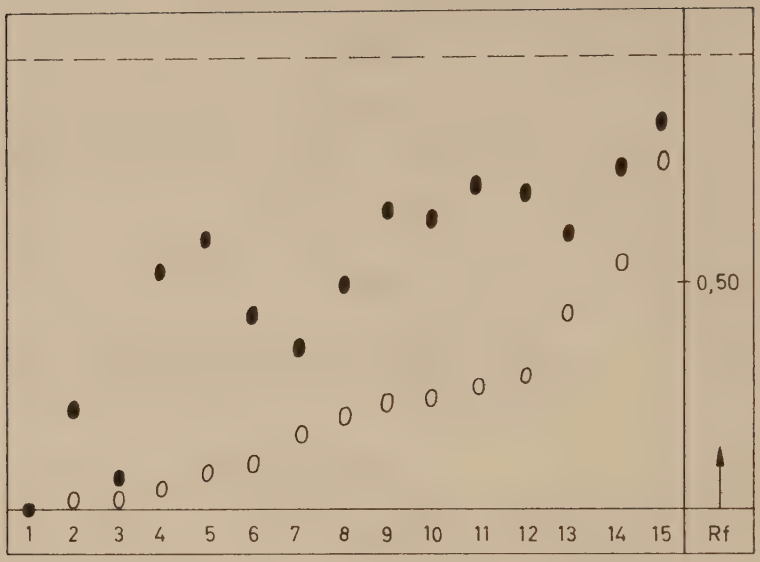


Abb. 2: Schematisches Dünnschichtchromatogramm der neutralen und sauren Antihypertonika

1 Methyldopa	6 Hydrochlorothiazid	11 Bendroflumethiazid
2 Chlorothiazid	7 Quinethazon	12 Polythiazid
3 Furosemid	8 Chlortalidon	13 Clopamid
4 Xipamid	9 Cyclopenthiazid	14 Mefrusid
5 Trichlormethiazid	10 Buthiazid	15 Spironolacton

Adsorbens: Kieselgel F_{254} 'Merck'

Fließmittel: 1. Chloroform/Methanol/NH_3 (25 %) 80 + 14 + 1

2. Essigsäureethylester (wassergesättigt)

Laufhöhe: 2 x 15 cm

Detektion: 1. UV-Licht

2. Ehrlich-Reagens (nach kurzem Erhitzen)

O = Laufhöhe in Fließmittel Nr. 1

● = Laufhöhe nach Entwickeln in Fließmittel Nr. 1 und 2

2. Farbreaktionen

a) Reaktionen der Antihypertonika auf der DC-Platte mit verschiedenen Sprühreagenzien

Nach der Chromatographie der Substanzen wurden die DC-Platten mit dem Reagens besprüht. Eine eventuell entstandene Färbung wurde vor und nach dem Erhitzen im Trockenschrank auf 100 °C beurteilt. Bereits vor dem Besprühen wiesen Dihydralazin (rot), Methyldopa (rotbraun) und Triamteren (gelb) eine Färbung auf. Die Dihydralazin-Base ist rot gefärbt, und Methyldopa wird unter oxidativen Einflüssen rotbraun.

Dragendorff-Reagens (Tab. 5): Alle basisch reagierenden Substanzen zeigten eine positive Reaktion. Nach Besprühen mit verdünnter Schwefelsäure und anschließendem Erhitzen zeigte zusätzlich Furosemid eine Violett- und Spironolacton eine Rotfärbung.

Ehrlich-Reagens (Tab. 5): Bereits vor dem Erhitzen färbten sich deutlich gelb: Dihydralazin, Xipamid, Buthiazid, Cyclopenthiazid und Polythiazid. Erst beim Erhitzen reagierten Hydrochlorothiazid, Trichlormethiazid und Bendroflumethiazid.

Schwefelsäure: Besonders auffallend ist die starke Gelbfärbung von Chlortalidon, die bei allen Schwefelsäure enthaltenden Reagenzien auftrat. Bemerkenswert ist auch das Rot von Spironolacton.

Froehde-Reagens ergab eine Grünfärbung bei Reserpin und bei Bendroflumethiazid. In eine Grünfärbung ging auch das Gelb des Buthiazid und Mefrusid beim Erhitzen über.

Mandelin-Reagens: Neben der Grünfärbung des Reserpins ist die blauschwarze Farbe des Bendroflumethiazid auffallend.

Tab. 5 (I): Farbreaktionen der Antihypertonika auf der DC-Platte mit verschiedenen Sprühmitteln

Basisch reagierende Stoffe

Substanz	Dragendorff-Reagens		Ehrlich-Reagens		Methanol / H_2SO_4		konz. HNO_3		Vanillin / H_2SO_4	
	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen
Reserpin	gelb	orange	gelb	braun	hellbraun	braun	ocker	braun	dunkel-violett	schwarz
Guanethidin	orange	orange								
Clonidin	orange	orange							gelb	
Tolazolin	orange	orange								
Dihydralazin	rot	rot	gelb	gelb						
Triamteren	orange	orange	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb

Neutralstoffe und sauer reagierende Stoffe

Spironolacton		rot		gelb	rotbraun	schwarz		gelbbraun	rot	schwarz
Methyldopa						rotbraun	gelb	braun	rotbraun	rotbraun
Chlorothiazid										braun
Hydrochlorothiazid				gelb		beige			gelb	ocker
Trichlormethiazid				gelb					gelb	gelb
Buthiazid			gelb	goldgelb	blaßgelb	beige			gelb	gelb
Cyclopenthiazid			gelb	gelb	gelb	braun		beige	beige	tiefbraun
Polythiazid			gelb	gelb		braun	hellgelb	beige	gelb	braun
Bendroflumethiazid				gelb	gelb	braun		beige	gelb	gelb
Chlortalidon					gelb	gelb			gelb	blaßgelb
Furosemid		violett	rotbraun	braun	braun	schwarz	braun	braun	braun	schwarz
Clopamid										
Xipamid			gelb	gelb			gelb	gelb	gelb	
Quinethazon					blaßgelb				gelb	gelb
Mefrusid						braun				rotbraun

Tab. 5 (II): Farbreaktionen der Antihypertonika auf der DC-Platte mit verschiedenen Sprühmitteln

Basisch reagierende Stoffe

Substanz	Froehde-Reagens		Mandelin-Reagens		Marquis-Reagens		Erdmann-Reagens	
	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen	vor Erhitzen	nach Erhitzen
Reserpin	grün	grasgrün	grün	grün	braun	schwarz	braun	braun
Guanethidin								
Clonidin						blaßgelb		
Tolazolin						braun		
Dihydralazin						weiß		
Triamteren*	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb

Neutralstoffe und sauer reagierende Stoffe

Spironolacton	rotbraun	schwarz	rotbraun	rotbraun	rotbraun	schwarz	rotbraun	schwarz
Methyldopa	rotbraun	rotbraun		braun	violett	blauschwarz	braun	braun
Chlorothiazid			gelb		blaßgelb	gelb		
Hydrochlorothiazid		braun		braun		beige	gelb	beige
Trichlormethiazid			weiß				gelb	beige
Buthiazid	blaßgelb	grün	weiß	braun	hellgelb	braun	ocker	beige
Cyclopenthiazid	rotbraun	rotbraun	braun	braun	ocker	braun	rotbraun	dunkelbraun
Polythiazid	hellbraun	braun	weiß	braun	beige	braun	blaßbraun	blaßbraun
Bendroflumethiazid	blaugrün	braun	blauschwarz	braun	braun	schwarz	braun	braun
Chlortalidon	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb	gelb
Furosemid	schwarz	schwarz	schwarz	schwarz	braun	tiefbraun	schwarz	schwarz
Clopamid			hellgelb					
Xipamid			weiß	braun		ocker		
Quinethazon								
Mefrusid		grün	hellgelb	braun		braun		hellbraun

* Die Substanz Triamteren besitzt bereits eine gelbe Eigenfärbung.

Mit dem Marquis-Reagens läßt sich Methyldopa, das mit den anderen Sprühmitteln nur rotbraune Töne gibt, violett bis blauschwarz anfärben.

Zusammenfassend läßt sich zu den Farbreaktionen mit Vanillin/H_2SO_4, mit Erdmann-, Mandelin- und Marquis-Reagens sagen, daß die entstandenen Gelb-, Braun- und Schwarz-Färbungen für die einzelnen Substanzen wenig charakteristisch sind. Sie können jedoch zusammen mit dem Rf-Wert die Identität einer Substanz bei der Dünnschichtchromatographie sichern helfen.

Fluoreszenz im UV-Licht (254 nm) ist bei Triamteren, Quinethazon und Bendroflumethiazid festzustellen.

b) Reaktionen der Antihypertonika in Lösung

Alkaloidfarbreagenzien

Auf einer Tüpfelplatte werden die Substanzen tropfenweise mit dem jeweiligen Reagens versetzt. Das Ergebnis (Tab. 6) läßt sich wie folgt zusammenfassen:

- Methanol/H_2SO_4 ergibt mit Chlortalidon, Bendroflumethiazid und Furosemid charakteristische Färbungen.
- Vanillin/H_2SO_4 eignet sich für die Substanzen Reserpin, Spironolacton, Cyclopenthiazid und Chlortalidon.
- Froehde-Reagens ergibt mit Reserpin, Cyclopenthiazid, Bendroflumethiazid und Chlortalidon brauchbare Färbungen.
- Reserpin, Spironolacton, Bendroflumethiazid und Chlortalidon lassen sich auch mit Mandelin-Reagens nachweisen.
- Marquis-Reagens eignet sich für die Substanzen Spironolacton, Methyldopa, Polythiazid und Chlortalidon.
- Mit Erdmann-Reagens lassen sich die Substanzen Bendroflumethiazid, Chlortalidon und Furosemid charakterisieren.
- Auffallend ist eine Gasentwicklung bei Zugabe der stark sauren Reagenzien zu den Substanzen Clonidin und Tolazolin.

Tab. 6: Reaktion der Antihypertonika mit Alkaloidfarbreagenzien in Lösung

Basisch reagierende Stoffe

Substanz	Methanol/H_2SO_4	Vanillin/H_2SO_4	Froehde	Mandelin	Marquis	Erdmann
Reserpin	orange	rot → violett	tiefblau	grün	schwarz	grün
Guanethidin						
Clonidin						
Tolazolin						
Dihydralazin						gelb
Triamteren			orange			

Neutralstoffe und sauer reagierende Stoffe

Spironolacton	gelb	rot	rotbraun	rot	gelb → rot	orange → braun
Methyldopa			rot	rosa	violett	braun
Chlorothiazid				gelb		
Hydrochlorothiazid						gelb
Trichlormethiazid		gelb				
Buthiazid				rosa	gelb	gelb
Cyclopenthiazid	rotbraun	rot	blutrot	orange	orange	orange
Polythiazid	rotbraun	hellgrün	grün	orange	leuchtend rot	schmutzig grün
Bendroflumethiazid	blau	braun	violett	violett	braun	violett
Chlortalidon	zitronengelb	zitronengelb	zitronengelb	zitronengelb	zitronengelb	zitronengelb
Furosemid	weinrot	blauschwarz	braun	braun	braun	olivgrün
Clopamid						
Xipamid				rosa		
Quinethazon	gelb		gelb		gelb	gelb
Mefrusid						

Fällungsreaktion mit Mayer-Reagens

Die basischen Substanzen Reserpin, Guanethidin, Clonidin, Tolazolin, Dihydralazin und Triamteren geben mit Mayer-Reagens Fällungen.

Verhalten gegen $KMnO_4$-Lösung

Eine neutrale oder schwach saure Lösung der Substanzen wurde tropfenweise mit 0,1 proz. $KMnO_4$-Lösung versetzt. Eine Entfärbung ohne Erhitzen trat bei Reserpin, Guanethidin und Dihydralazin ein. Nach leichtem Erhitzen entfärbten auch folgende Substanzen die $KMnO_4$-Lösung: Spironolacton, Hydrochlorothiazid, Trichlormethiazid, Buthiazid, Polythiazid, Bendroflumethiazid, Furosemid, Clopamid, Xipamid und Quinethazon.
Die Methyldopa-Lösung wurde durch $KMnO_4$-Zugabe stark rot gefärbt.

Diazo-Reaktion

Die salzsaure Lösung der Substanzen wurde 5 bis 10 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlen der Lösung wurde im sauren Milieu mit $NaNO_2$ diazotiert und im Alkalischen mit 2-Naphthol gekuppelt. Eine positive Reaktion (orangerote Färbung) ergaben: Hydrochlorothiazid, Trichlormethiazid, Buthiazid, Cyclopenthiazid, Polythiazid, Bendroflumethiazid, Furosemid und Quinethazon.
Ohne vorausgehende saure Hydrolyse war die Diazo-Reaktion bei sämtlichen Substanzen negativ.

Chromotropsäure-Reaktion

Die Substanz wird mit dem Chromotropsäure-Reagens einige Minuten erhitzt. Die Ergebnisse dieser Reaktion sind in Tabelle 7 aufgeführt.
Eine violette Färbung trat bei Hydrochlorothiazid, Trichlormethiazid und Bendroflumethiazid auf.
Bei der Durchführung dieser Reaktion mit Spironolacton

fiel eine starke grüne Fluoreszenz auf. Nach wenigen Minuten ging die Fluoreszenz in eine Rotfärbung über. (Versetzt man Spironolacton mit konz. Schwefelsäure, so tritt eine gelbe Fluoreszenz auf, die gleichfalls in eine intensive Rotfärbung übergeht).
Die gelbe Färbung von Chlortalidon ist bei der Reaktion mit dem Chromotropsäure-Reagens wie mit Schwefelsäure allein festzustellen.

Tab. 7: Auftretende Färbungen bei der Chromotropsäure-Reaktion

Substanz	vor Erhitzen	nach Erhitzen (5 min im Wasserbad bei 100 °C)
Reserpin	gelb	gelbgrün
Hydrochlorothiazid	violett	violett
Trichlormethiazid		violett
Polythiazid	gelb	rotbraun
Bendroflumethiazid	violett	violett
Chlortalidon	leuchtend gelb	leuchtend gelb
Furosemid	orange	rotbraun
Quinethazon		grün
Spironolacton	grüne Fluoreszenz	rot

Tab. 8: Färbungen bei der Zwikker-Reaktion

Substanz	nach Zugabe von Zwikker-Reagens I	nach Zugabe von Zwikker-Reagens II
Reserpin		braun
Guanethidin		
Guanethidinsulfat		
Clonidin	kräftig blau	kräftig blau
Clonidinhydrochlorid	hellblau	kräftig blau
Tolazolin	blau	blau
Tolazolinhydrochlorid	hellblau	blau
Dihydralazin	rot	braun-schwarz
Dihydralazinsulfat		braun-schwarz
Triamteren		grün
Spironolacton		rotbraun
Methyldopa		rotbraun
Chlorothiazid		tiefblau
Hydrochlorothiazid		tiefblau
Trichlormethiazid		blau
Buthiazid		blau
Cyclopenthiazid		blau
Polythiazid		violett
Bendroflumethiazid		blau
Chlortalidon		blau
Furosemid		lila
Clopamid		blau
Xipamid		lila
Quinethazon		violett
Mefrusid		violett

Zwikker-Reaktion

Diese Reaktion, nach der Vorschrift des DAB 7 [5] durchgeführt, führt zu folgenden Ergebnissen (Tab. 8):
Bereits eine Blaufärbung nach Zugabe von Zwikker-Reagens I (1 % Cobalt(II)-nitrat in Methanol) entsteht bei Clonidin, Tolazolin und deren Salzen. Auf Zusatz von Zwikker-Reagens II (10 % Piperidin in Methanol) vertiefen sich die Färbungen. Sämtliche Thiadiazin-, Dihydrothiadiazin- und Chlorbenzolsulfonamidderivate geben nach Zusatz von Zwikker-Reagens II eine positive Reaktion.
Wurde die Zwikker-Reaktion nach der Vorschrift der Ph. Eur., wie sie als Identitätsreaktion auf Barbiturate beschrieben ist [6], durchgeführt, so ergaben sich keine Unterschiede. Anstelle Zwikker-Reagens II wird nach Ph. Eur. die methanolische Lösung der Substanz und Cobalt(II)-acetat mit Natriumtetraborat versetzt und zum Sieden erhitzt.

c) Spezielle Nachweisreaktionen für einzelne Substanzen

Reserpin

$FeCl_3$-Reaktion nach HOFFMANN [7]: Die Lösung der Substanz in konz. Schwefelsäure wird mit Eisen(III)-chlorid-Lösung versetzt. Die dabei entstehende tiefe Blaufärbung schlägt nach Zugabe von verdünnter Salpetersäure nach Gelbbraun um.
Diese Reaktion, nach der Vorschrift des DAB 7 ausgeführt, ist nur für Reserpin positiv. Sie verläuft für die restlichen hier untersuchten Antihypertonika negativ.

---

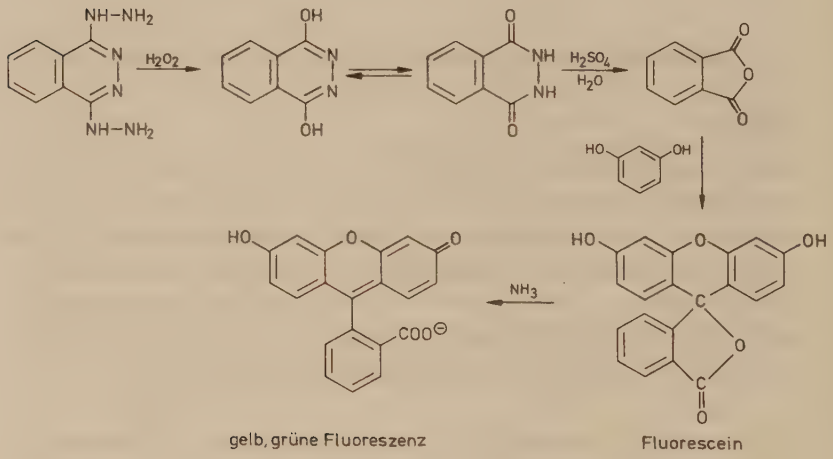
5) H. Böhme, K. Hartke: Deutsches Arzneibuch. 7. Ausgabe 1968, Kommentar. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1973. S. 705, 707.

6) H. Böhme, K. Hartke: Europäisches Arzneibuch. Bd I u. II, Kommentar. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1976. S. 113.

7) A. Hoffmann: Rauhimbin und Isorauhimbin, zwei neue Alkaloide aus Rauwolfia serpentina Benth., Helv. Chim. Acta 37, 314 (1954).

Dihydralazin

- Eine Lösung der Substanz in Wasser (die Base wird mit verd. Schwefelsäure in Lösung gebracht) ergibt mit 2 Tropfen Eisen(III)-chlorid-Lösung eine rotviolette Färbung. Diese Reaktion, beschrieben im 2 AB DDR, ist spezifisch.
- Die Substanz wird mit konz. Wasserstoffperoxid-Lösung und tropfenweise mit konz. Schwefelsäure versetzt. Die Mischung wird erhitzt, bis weiße Nebel entstehen und mit Resorcin versetzt. 1 Tropfen der erkalteten Mischung wird in verd. NH_3-Lösung gegeben. Die Mischung zeigt eine gelbe Färbung und grüne Fluoreszenz. [8)]
  Nach 2 AB DDR, Kommentar, entsteht bei dieser Reaktion unter dem Einfluß von H_2O_2 und H_2SO_4 Phthalsäureanhydrid, das mit Resorcin zu Fluorescein reagiert.



8) Identitätsprüfung von Dihydralazinum bitartaricum, 2 AB DDR.

Guanethidin

- Die freie Guanidino-Gruppe des Guanethidin läßt sich mit der Reaktion nach Sakaguchi nachweisen. Zu einer Lösung der Substanz in Wasser gibt man 10 proz. Natronlauge und 0,05 proz. ethanolische 1-Naphthol-Lösung. Zu der auf etwa 15 °C abgekühlten Mischung tropft man eine Natriumhypobromit-Lösung. Es tritt eine rotviolette Färbung auf.
  Mit dieser Reaktion läßt Brit. 73 die Identität von Guanethidin nachweisen.
- Bei vorsichtigem Schmelzen der Substanz treten nach Ammoniak riechende Dämpfe auf, die angefeuchtetes rotes Lackmuspapier blau färben.

Methyldopa

- Die Substanz wird in 0,1 N-HCl gelöst und mit 1 proz. Eisen(III)-chlorid-Lösung versetzt. Es entsteht eine grüne Färbung, die auf Zusatz von Ammoniak nach Purpurrot, auf Zusatz von NaOH nach Rot umschlägt.
  In saurer Lösung ist eine Grünfärbung mit Fe^{3+} typisch für Brenzkatechinabkömmlinge.
- Wird eine wässrige Lösung der Substanz mit Oxidationsmitteln wie $NaIO_3$, $K_3[Fe(CN)_6]$, $KClO_3$ versetzt, so entsteht eine rote Färbung, die sich rasch nach Braun vertieft. Die Reaktion kann dadurch beschleunigt werden, daß vor Zugabe des Oxidationsmittels mit 10 proz. $NaHCO_3$-Lösung leicht alkalisiert wird.
  Die Rotfärbung, die auch bei längerem Aufbewahren einer wässrigen Methyldopa-Lösung auftritt, beruht auf der Bildung eines Adrenochrom analogen Farbstoffes (vgl. Kap. VI).

Spironolacton

- Die Substanz wird in konz. Schwefelsäure gelöst. Es tritt sofort eine gelbgrüne, sehr intensive Fluoreszenz auf, die jedoch von einer orangeroten und schließlich

tiefroten Färbung abgelöst wird. Beim Verdünnen der Lösung mit etwa 10 ml Wasser tritt ein Farbwechsel nach Gelb auf.
Diese für Spironolacton positive Reaktion ist in der Literatur [9] als Nachweisreaktion für Hydrocortison beschrieben.

- Eine Lösung von einigen mg Substanz in 2 bis 3 ml Chloroform wird mit etwa 3 ml konz. Schwefelsäure unterschichtet. In der Chloroformschicht tritt nach Gelbfärbungen nach einer Weile eine tiefe Rotfärbung auf (Salkowski-Reaktion).
- Die nach AUTERHOFF/KOVAR [10] durchgeführte Jod-Azid-Reaktion, durch die zweibindiger Schwefel nachgewiesen werden kann, verlief negativ. Die Reaktion wird wohl durch die reduzierenden Eigenschaften der Substanz gestört (α-Ketol-Gruppierung).

Polythiazid

- Die Jod-Azid-Reaktion als Nachweis zweibindigen Schwefels verlief negativ. Die Reaktion wird wohl durch die reduzierenden Eigenschaften der Substanz gestört.
- Wird die Substanz in 10 proz. Natronlauge erhitzt, so tritt intensiver Geruch nach H_2S auf.

Trichlormethiazid

Das Trichlormethiazid-Molekül enthält aliphatisch gebundene Chlor-Atome im Dichlormethyl-Substituenten. Nach alkalischer Hydrolyse in 10 proz. Natronlauge kann in der mit verd. Salpetersäure angesäuerten Lösung mit $AgNO_3$-Lösung Chlorid nachgewiesen werden.

---

9) H. Auterhoff, K.-A. Kovar: Identifizierung von Arzneimitteln. 3. neubearbeitete und erweiterte Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1977. S. 105.

10) Ibid. S. 25.

Bendroflumethiazid

Erhitzt man die Substanz mit 1 proz. $KMnO_4$-Lösung und verdünnter Schwefelsäure, so entsteht der Geruch nach Benzaldehyd.

3. UV-Spektroskopie

a) UV-Spektren der basisch reagierenden Substanzen (Abb. 40 - 44)

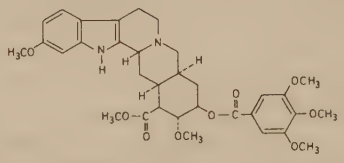
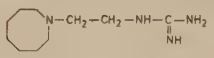
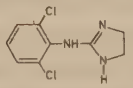
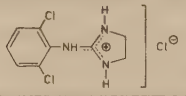
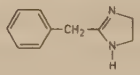
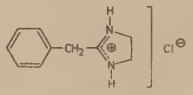
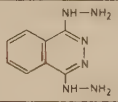
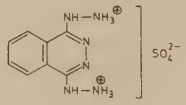
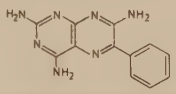
Die UV-Spektren der Basen haben gegenüber den Salzen meist im höheren Wellenbereich liegende Maxima. Am extremsten ist der Unterschied zwischen Dihydralazin-Base und Dihydralazin-Salz. Für die Base liegt das Maximum im längerwelligen UV bei 354 nm, für das Salz bei 310 nm. Eine solche Verschiebung nach kürzeren Wellenlängen läßt sich damit erklären, daß durch Protonierung des Stickstoffs die Konjugation einsamer Elektronenpaare an den Stickstoffatomen mit dem π-System des Aromaten eingeschränkt bzw. aufgehoben wird.[11)]

Der Kurvenverlauf der basischen Antihypertonika ist charakteristisch und kann zur Identifizierung herangezogen werden. Allerdings kann Guanethidin UV-spektroskopisch nicht erfaßt werden, da diese Substanz praktisch keine UV-Absorption zeigt.

---

11) D.H. Williams, I. Fleming: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung. 3. Auflage. G. Thieme Verlag, Stuttgart 1975. S. 15.

UV-Spektren der basisch reagierenden Substanzen

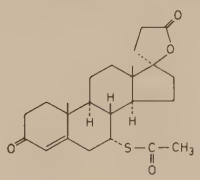
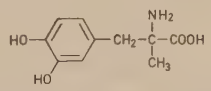
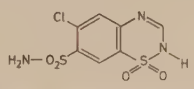
Substanz	Strukturformel	λ max. I nm	λ max. II nm	λ max. III nm
Reserpin		220 (4.57)	267 (4.14)	294 (3.93)
Guanethidin		—	—	—
Clonidin-Base		212 (3.84)	278 (2.64)	285 (2.55)
Clonidin-Hydrochlorid		217 (3.97)	270 (2.73)	277 (2.63)
Tolazolin-Base		212 (3.75)	257 (2.41)	263 (2.17)
Tolazolin-Hydrochlorid		212 (3.69)	255 (2.29)	261 (2.09)
Dihydralazin-Base		216 (4.06)	276 (3.67)	354 (3.46)
Dihydralazin-Sulfat		217 (4.42)	270 (3.75)	310 (3.57)
Triamteren		230 (4.40)	265 (3.97)	367 (4.09)

Der Logarithmus des molaren Extinktionskoeffizienten ε ist in Klammern angegeben.

b) UV-Spektren der Neutralstoffe und sauer reagierenden Substanzen (Abb. 45 - 48)

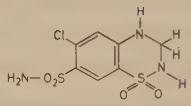
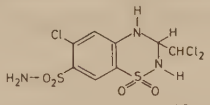
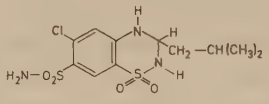
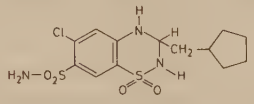
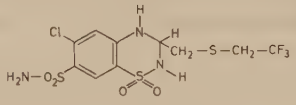
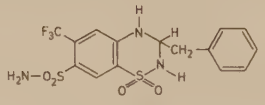
Die UV-Kurven von Spironolacton, Methyldopa und Chlorothiazid weisen charakteristische Maxima auf. Dagegen ergeben die sechs Dihydrothiadiazinderivate nahezu identische Spektren. Bis auf Clopamid und Mefrusid, deren Maxima ziemlich nahe zusammen liegen, geben die Chlorbenzolsulfonamidderivate charakteristische Kurven.

Die UV-Spektroskopie kann für die Stoffklasse der Antihypertonika nur begrenzt eingesetzt werden. Sechs Dihydrothiadiazinderivate, Clopamid, Mefrusid und Guanethidin können nicht eindeutig bzw. gar nicht identifiziert werden.

Substanz	Strukturformel	λ max. I nm	λ max. II nm	λ max. III nm
Spironolacton		237 (4.19)		
Methyldopa		279 (3.45)		
Chlorothiazid		225 (4.17)	279 (3.74)	

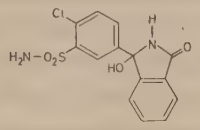
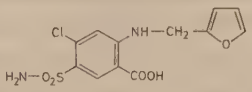
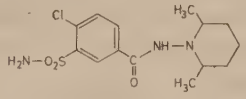
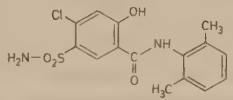
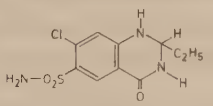
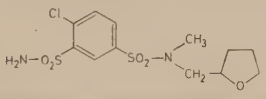
Der Logarithmus des molaren Extinktionskoeffizienten ε ist in Klammern angegeben.

Dihydrothiadiazinderivate

Substanz	Strukturformel	λ max. I nm	λ max. II nm	λ max. III nm
Hydrochlorothiazid		218 (4.44)	269 (4.25)	315 (3.56)
Trichlormethiazid		216 (4.38)	265 (4.28)	310 (3.46)
Buthiazid		225 (4.41)	270 (4.24)	316 (3.38)
Cyclopenthiazid		226 (4.31)	270 (4.22)	317 (3.39)
Polythiazid		223 (4.29)	266 (4.17)	312,5 (3.34)
Bendroflumethiazid		217 (4.20)	270 (4.25)	325 (3.50)

Der Logarithmus des molaren Extinktionskoeffizienten ε ist in Klammern angegeben.

Chlorbenzolsulfonamidderivate

Substanz	Strukturformel	λ max. I nm	λ max. II nm	λ max. III nm
Chlortalidon		227 (4.15)	274 (3.20)	282 (3.08)
Furosemid		231 (4.53)	270 (4.25)	338 (3.64)
Clopamid		232 (4.04)	277 (3.19)	287 (3.06)
Xipamid		230 (4.57)	259 (4.21)	325 (3.83)
Quinethazon		233 (4.59)	277 (3.97)	343 (3.31)
Mefrusid		235 (3.69)	278 (2.90)	287 (2.69)

Der Logarithmus des molaren Extinktionskoeffizienten ε ist in Klammern angegeben.

V. Trennung von Substanzgemischen nach Stas-Otto

Bei der Therapie der Hypertonie werden sehr oft mehrere antihypertensiv wirkende Substanzen gleichzeitig eingesetzt. Ein großer Teil der sich im Handel befindenden Antihypertonika sind aus diesem Grunde Kombinationspräparate. Meist wird eine saluretische Komponente (Spironolacton, Triamteren, Dihydrothiadiazinderivate und Chlorbenzolsulfonamidderivate) mit einer sympathicolytischen bzw. einer direkt gefäßerweiternden Substanz (Reserpin, Dihydralazin, Guanethidin, Clonidin, Tolazolin, Methyldopa) kombiniert. So ist von Interesse, zu überprüfen, ob der Trennungsgang nach Stas-Otto zu brauchbaren Ergebnissen führt.

Der Stas-Otto-Gang wurde in der Modifikation nach AUTERHOFF/KOVAR [12] durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils 100 mg der Substanz. Nach Verdampfen der Lösungsmittel wurde gravimetrisch bestimmt, welcher prozentuale Anteil der eingesetzten Substanz in den einzelnen Fraktionen anfiel.

---

12) H. Auterhoff, K.-A. Kovar: Identifizierung von Arzneimitteln. 3. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1977.

Tab. 9: Die Verteilung der Substanzen auf die Fraktionen des Stas-Otto-Gangs

Fraktion I A: Der Etherauszug aus saurem Milieu wird mit NaOH ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird angesäuert und mit Ether ausgeschüttelt (Sauer reagierende Substanzen)

Substanz	Anfall in Gewichts-prozent	Substanz	Anfall in Gewichts-prozent
Chlorothiazid	3,5	Bendroflumethiazid	31,0
Hydrochlorothiazid	2,0	Chlortalidon	9,0
Trichlormethiazid	16,0	Furosemid	44,0
Buthiazid	28,0	Clopamid	13,0
Cyclopenthiazid	58,0	Xipamid	62,0
Polythiazid	17,0	Mefrusid	63,0

Fraktion I B: Der mit NaOH ausgeschüttelte Etherauszug aus saurem Milieu (Neutralstoffe)

Substanz	Anfall in Gewichtsprozent
Spironolacton	98,0
Triamteren	3,0

Fraktion II: Chloroformauszug aus leicht saurem Milieu (Chloroformlösliche Neutralstoffe)

Substanz	Anfall in Gewichtsprozent
Reserpin	99,0
Triamteren	7,0

Fraktion III: Etherauszug aus alkalischem Milieu (Basen)

Substanz	Anfall in Gewichtsprozent
Guanethidin	35,0 51 (im Chloroformauszug)
Clonidin	98,0
Tolazolin	99,0
Dihydralazin	3,0 18 (im Chloroformauszug)
Triamteren	6,0

Fraktion IV: Chloroform-Isopropylalkohol-Auszug aus ammoniakalischem Milieu (Chloroformlösliche Basen)

Substanz	Anfall in Gewichtsprozent
Dihydralazin	42,0
Triamteren	8,0

Fraktion V: Nichtausschüttelbare Substanzen

Substanz	Anfall in Gewichts-prozent*	Substanz	Anfall in Gewichts-prozent*
Dihydralazin	37	Polythiazid	83
Guanethidin	14	Bendroflumethiazid	69
Triamteren	- **	Chlortalidon	91
Methyldopa	100	Furosemid	50
Chlorothiazid	96,5	Clopamid	87
Hydrochlorothiazid	88	Xipamid	38
Trichlormethiazid	84	Quinethazon	100
Buthiazid	72	Mefrusid	37
Cyclopenthiazid	42		

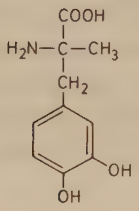
* Errechnet aus Differenz zwischen eingesetzter Menge Substanz und dem Anfall von Fraktion I - IV.

** Triamteren blieb beim Ausschütteln ungelöst zwischen den Phasen. Auch in Fraktion V war noch Substanz ungelöst.

Eindeutige und zufriedenstellende Trennungen können mit dem Stas-Otto-Gang für Reserpin, Clonidin, Tolazolin, Spironolacton und Methyldopa erzielt werden. Obwohl die restlichen Substanzen in zwei oder mehreren Fraktionen anfallen, kann mit Hilfe des Stas-Otto-Ganges die Identität eines unbekannten Antihypertonikums eingegrenzt werden. So ist beispielsweise durch Fraktion I A die Zahl der infrage kommenden Substanzen von 21 auf 13 reduziert. Bei den Fraktionen I B, II, III und IV ist die Selektion noch weit größer.

Führt man den Stas-Otto-Gang mit Substanzgemischen durch, wie sie in Zusammensetzung und Dosierung als Kombinationspräparate im Handel sind, so fallen die einzelnen Substanzen in denselben Fraktionen an (vgl. Tab. 11 in Kap. X). Unterschiede ergeben sich lediglich in quantitativer Hinsicht. Der prozentuale Anteil an der Gesamteinwaage, der in den einzelnen Fraktionen anfällt, ist beispielsweise bei Reserpin und Clonidin nicht mehr gravimetrisch bestimmbar, da die Gesamteinwaage von Reserpin (10 Tabletten der gängigen Kombinationspräparate zugrundegelegt) etwa 1 mg, von Clonidin (10 Tabletten von Combipresan^{R} zugrundegelegt) 0,75 mg beträgt. Dünnschichtchromatographisch läßt sich jedoch Reserpin in Fraktion II und Clonidin in Fraktion III noch nachweisen. Zum anderen ist bei der Trennung von Substanzgemischen, die analog der sich im Handel befindlichen Kombinationspräparate neben Reserpin eine relativ große Menge eines Diuretikums beinhalten, festzustellen, daß sich der prozentuale Anteil dieser Komponente, wie er ausgeschüttelt werden kann, erniedrigt. Beispielsweise sinkt die in Fraktion I A anfallende Menge von Chlortalidon (Einwaage 500 mg: zugrundegelegt 10 Tabletten Darebon^{R} mit jeweils 0,25 mg Reserpin und 50 mg Chlortalidon) von 9 Prozent auf 2 Prozent.

VI. Zur Analytik von Methyldopa



1. Oxidation von Methyldopa zu einem roten Farbprodukt

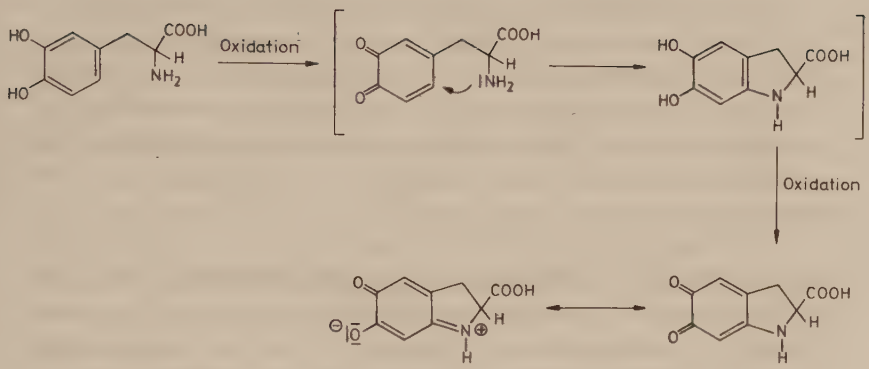
Läßt man eine wässrige Methyldopa-Lösung unter Luftzutritt stehen, so tritt innerhalb weniger Stunden eine Rotbraun-Färbung auf. Diese Reaktion läßt sich durch Zugabe von Alkalisierungsmitteln zur Lösung beschleunigen. Das Rotbraun einer stark alkalischen Lösung, das innerhalb weniger Minuten durch Schütteln zu erreichen ist, vertieft sich rasch. Nach 24 Stunden entsteht eine tiefe Schwarzbraun-Färbung.

Bei Einsatz von Oxidationsmitteln wie $NaIO_3$ und $K_3[Fe(CN)_6]$ tritt eine tiefe Rotfärbung augenblicklich auf. Allerdings verläuft die Reaktion nur bei einem pH-Wert >7. In saurem Milieu ergibt ein Oxidationsversuch eine gelbgrüne Fluoreszenz.

Zum Vergleich wurde Dopa herangezogen. Dopa zeigt in neutralem bis schwach alkalischem Milieu folgendes Oxidationsverhalten: [13)]

---

13) H. Wyler, J. Chiovini, Helv. Chim. Acta 51, 1477 (1968).



1927 erklärte RAPER [14] mit dieser Reaktion die Rötung von Dopa-Lösungen unter oxidativen Bedingungen. Er nahm an, daß aus Dopa über Dopa-Chinon durch intramolekulare Aminaddition eine Dihydroindol-Verbindung (WYLER und DREIDING wählten für diese Verbindung den Trivialnamen "Cyclodopa" [15]) entsteht, welche rasch zum roten Dihydroindol-Chinon, später Dopachrom genannt [16], oxidiert wird.

Es zeigte sich später, daß das Formelschema allgemein dem Oxidationsverhalten der Catecholamine entspricht [17]. Am Beispiel des Catecholamins Adrenalin konnten HAWLEY und Mitarbeiter [18] den von Raper vorausgesetzten Reaktionsweg bestätigen. Mit Hilfe einer schnell arbeitenden elektrochemischen Meßmethode (potentiostatic chronoamperometry) konnten sie die Cyclisierung des primär gebildeten offenen Chinons quantitativ verfolgen. Diese Cyclisierung setzt aller-

---

14) H.S. Raper, Biochem. J. 21, 89 (1927).

15) H. Wyler, M.E. Wilcox, A.S. Dreiding, Helv. Chim. Acta 48, 361 (1965).

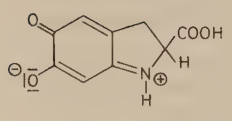
16) J.D. Bu'Lock, J. Harley-Mason, J. Chem. Soc. 1951, 2248.

17) R.A. Heacock, Chem. Rev. 59, 181 (1959).

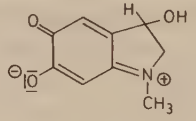
18) M.D. Hawley, S.V. Tatawawadi, S. Piekarsky, R.N. Adams, J. Amer. Chem. Soc. 89, 447 (1967).

dings eine freie primäre NH_2-Gruppe voraus [19]. Ist der Stickstoff protoniert, findet keine Cyclisierung statt, denn diese erfordert einen nucleophilen Angriff des Stickstoffs am C-6-Atom des Ringes. Dies erklärt unsere Beobachtung, daß eine Oxidation von Methyldopa in saurem Milieu nicht zu einer Rotfärbung, sondern zu einer gelbgrünen Fluoreszenz führt.

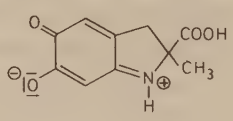
Die NH_2-Gruppe von Methyldopa in neutralem bis schwach alkalischem Milieu ist nicht protoniert. So kommt es bei der Oxidation wie bei Dopa und Adrenalin zu einer intramolekularen Aminaddition, die in Analogie zu der bereits von Raper postulierten Verbindung "Dopachrom" und zu der erstmals von GREEN und RICHTER [20] 1937 isolierten und identifizierten Verbindung "Adrenochrom" [21] zu "Methyldopachrom" führen könnte.



Dopachrom



Adrenochrom



Methyldopachrom

---

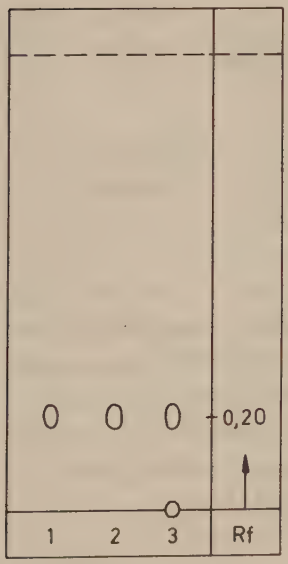
19) H. Wyler, J. Chiovini, Helv. Chim. Acta 51, 1477 (1968).

20) D.E. Green, D. Richter, Biochem. J. 31, 596 (1937).

21) Die Formulierung in der obigen Abbildung in einer den chemischen Eigenschaften besser gerecht werdenden zwitterionischen Form erfolgt nach J. Harley-Mason, J. Chem. Soc. 1950, 1276.

a) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der roten Farbstofflösung

Eine Lösung von Methyldopa in Phosphatpufferlösung pH 8 wurde mit einer Lösung von $K_3[Fe(CN)_6]$ in Phosphatpufferlösung pH 8 versetzt. Eine dunkle Rotfärbung trat sofort ein. Versuche, die rotgefärbte wässrige Lösung mit organischen Lösungsmitteln auszuschütteln, verliefen negativ. Auch pH-Veränderungen brachten keine positiven Ergebnisse. So wurde die Methyldopa-Farblösung im Reaktionsgemisch dc untersucht. Wie Abbildung 3 zeigt, unterscheiden sich Methyldopa und der bei der Oxidation entstandene Farbstoff in ihren Laufeigenschaften nur wenig. Allerdings zersetzt sich der Farbstoff bereits beim Auftragen auf die Kieselgelplatte. Während des Chromatographierens bildet sich durch oxidative Einflüsse aus Methyldopa zum Teil der



1 = Methyldopa

2 = Reaktionslösung sofort nach Oxidation

3 = Reaktionslösung, 2 Stunden nach Oxidation

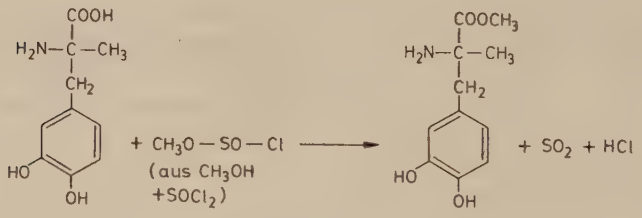
Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Butanol/Eisessig 90+10 (wassergesättigt)
Laufhöhe:	15 cm
Detektion:	1. UV-Licht 2. Besprühen mit 2 proz. $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung in Phosphatpuffer pH 8

Abb. 3: Schematisches Dünnschichtchromatogramm

Farbstoff, der sich allerdings ebenfalls zu braunen Produkten zersetzt. Ein zusätzlicher schwarzer Fleck bleibt am Start zurück bei der Lösung, die erst zwei Stunden nach Oxidation aufgetragen wurde.

b) Versuche zur Isolierung des roten Farbproduktes

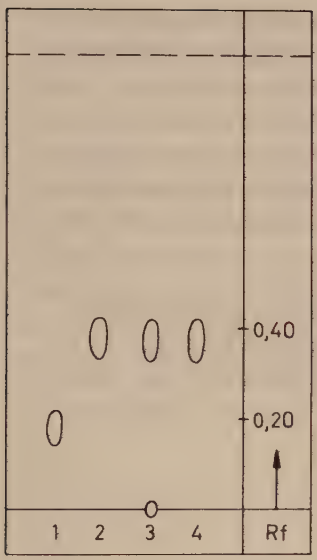
Methyldopa wurde mit $K_3[Fe(CN)_6]$ in Phosphatpufferlösung pH 8 oxidiert. Extraktionsversuche mit Chloroform, Ether, Essigsäureethylester und Butanol schlugen fehl. Wurde die Dissoziation der Säuregruppe durch Ansäuern der Lösung zurückgedrängt, so schlug die Rotfärbung in ein schmutziges Braun um. Um ein Ausschütteln des Farbstoffs bei pH 8 zu ermöglichen, wurde der Methylester von Methyldopa nach der Thionylchloridmethode hergestellt.



Nach BRENNER und HUBER [22] wurde zu Methanol Thionylchlorid bei - 20 °C zugetropft. In das Gemisch wurde Methyldopa gegeben, bei Raumtemperatur stehen gelassen und unter Rückfluß gekocht. Der ölige Rückstand nach Abdampfen im Vakuumrotationsverdampfer wurde in wenig Methanol gelöst und mit Petrolether das weiße Esterprodukt ausgefällt.

---

22) M. Brenner, W. Huber, Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953).



1 = Methyldopa (Rf = 0,20)

2 = Methyldopamethylester (Rf = 0,40)

3 = Rote Farbstofflösung nach der Oxidation des Methyldopamethylesters mit $K_3[Fe(CN)_6]$

4 = Chloroformextrakt aus 3

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Butanol/Eisessig 90+10 (wassergesättigt)
Laufhöhe:	15 cm
Detektion:	1. UV-Licht
	2. 2 proz. $K_3[Fe(CN)_6]$ Phosphatpufferlösung pH 8

Abb. 4: Schematisches Dünnschichtchromatogramm des Methyldopamethylesters

Die mit $K_3[Fe(CN)_6]$ wie oben beschrieben oxidierte wässrige Methyldopamethylester-Lösung wurde mit Butanol ausgeschüttelt. Der Farbstoff ging in die Butanol-Phase. Der rote lackartige, ölige Rückstand nach Abziehen des Butanols im Vakuum veränderte seine Farbe relativ schnell hin zu tiefbraun bis schwarz. Der Empfindlichkeit gegen Luftsauerstoff wegen war es nicht möglich, den Rückstand zu untersuchen.

c) Elektronenspektroskopische Untersuchung des Butanolextrakts aus der Methyldopamethylester-Reaktionslösung

Der rot gefärbte Butanolauszug aus der Methyldopamethylester-Oxidations-Lösung wurde kurz mit Na_2SO_4 getrocknet, mit Butanol verdünnt und möglichst schnell elektronenspektroskopisch gemessen. Es ergaben sich Absorptionsmaxima bei 468 und 291 nm (Abb. 5).

Die Labilität der Farbstofflösung wurde spektroskopisch verfolgt. Bereits nach 60 Minuten verschob sich das Maximum bei 468 nm nach 463 nm und die Extinktion fiel. Nach 3 Tagen war dieses Maximum nahezu gänzlich verschwunden.

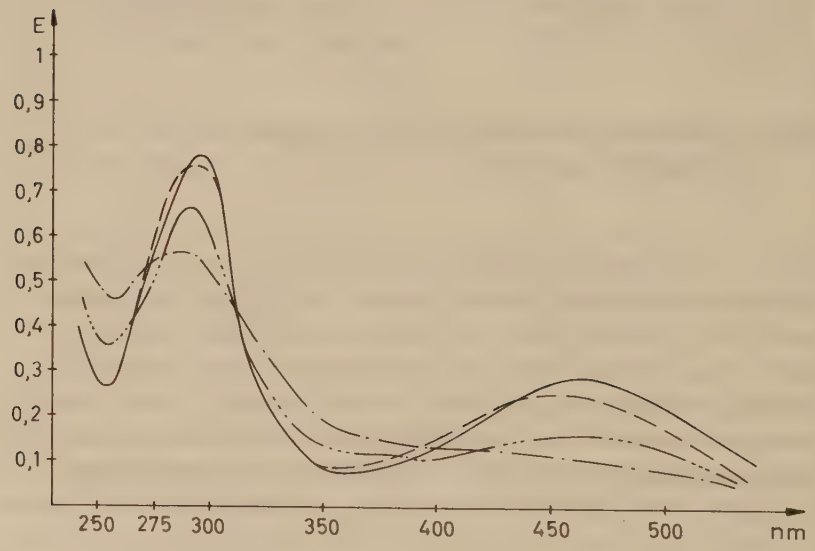


Abb. 5: UV-Spektren des roten Farbstoffs in Butanol

——— = nach 15 Minuten
----- = nach 60 Minuten
—···—··· = nach 24 Stunden
·—·—·— = nach 72 Stunden

Die Absorptionskurve der roten Farbstofflösung zeigt große Ähnlichkeit mit der einer butanolischen Lösung von Adrenochrom. Die Adrenochromlösung wurde nach ROTH und VOLKMANN [23] hergestellt. Zu einer borsäurehaltigen Adrenalinlösung wird $NaNO_2$ gegeben und auf dem Wasserbad erhitzt, bis eine dunkelrote Färbung entsteht. Der Butanolauszug wurde rasch mit Na_2SO_4 getrocknet, verdünnt und zur Messung gebracht. Die Absorptionsmaxima liegen bei 480 und 295 nm (Abb. 6). Die Ähnlichkeit der Absorptionskurve von dem roten Methyldopamethylester-Oxidationsprodukt mit der von Adrenochrom läßt auf eine ähnliche Struktur schließen.

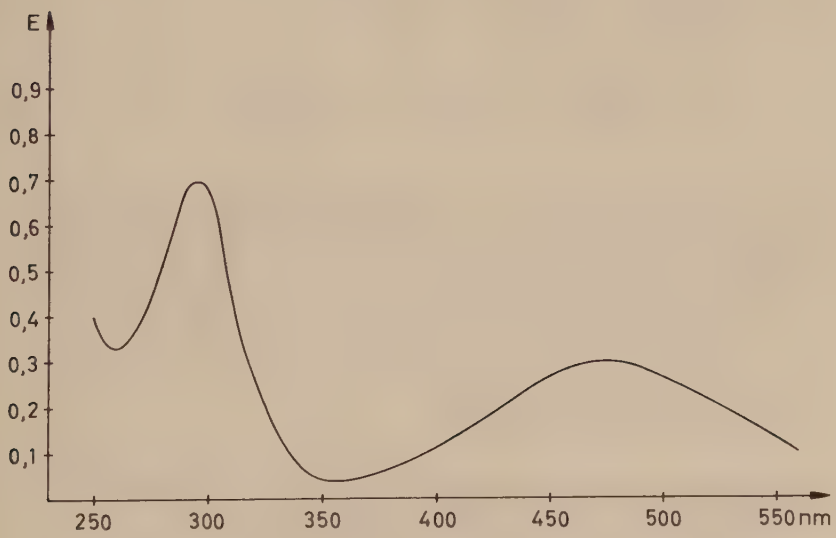
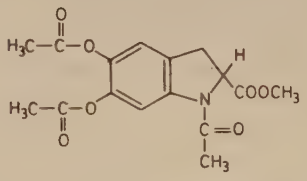


Abb. 6: UV-Spektrum von Adrenochrom in Butanol

23) H.J. Roth, U. Volkmann, Arch. Pharm. (Weinheim) 302, 450 (1969).

d) Reduktion und Acetylierung des Farbproduktes

Das bei der Oxidation von Dopa entstehende Dopachrom ließ sich in Substanz nicht isolieren, da es sich leicht zersetzte. WYLER und CHIOVINI[24] gelang es, den Dopachrommethylester zu stabilisieren, indem sie den Dopachrommethylester sofort nach der Oxidation zum farblosen Cyclodopamethylester reduzierten und nach der Reduktion acetylierten. Sie erhielten den O,O,N-Triacetylcyclodopa-methylester:



O,O,N-Triacetylcyclodopa-methylester

Diese Methode von Wyler und Chiovini wandten wir auf Methyldopa an, um so den bei der Oxidation von Methyldopamethylester entstehenden roten Farbstoff in seiner reduzierten und acetylierten Form näher zu charakterisieren. Wir arbeiteten mit dem nach Brenner und Huber hergestellten Methylester, wodurch vor allem die Reinigung des Endproduktes erleichtert wurde.

Das Verfahren, nach dem vorgegangen wurde, gliedert sich im wesentlichen in drei Reaktionsschritte:

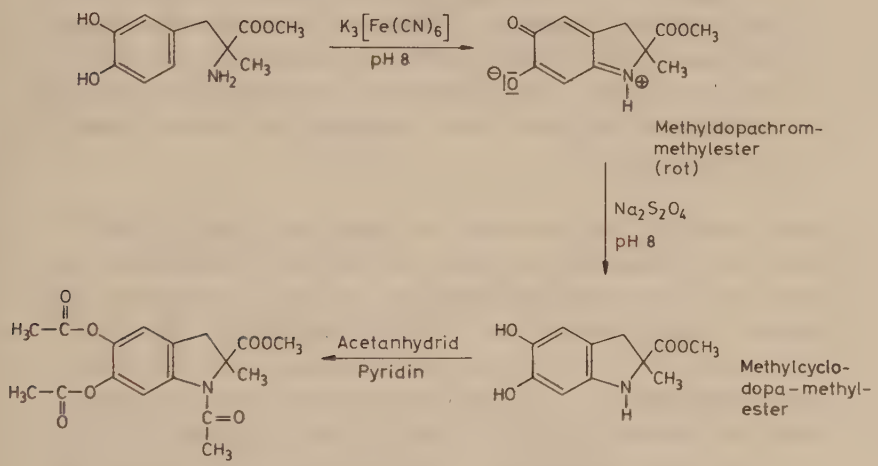
1. Methyldopa-methylester wird in auf pH 8 gepufferter Lösung mit überschüssigem $K_3[Fe(CN)_6]$ oxidiert, wobei eine Rotfärbung auftritt.
2. Nach wenigen Sekunden wird mit Natriumdithionit ($Na_2S_2O_4$) bis zur Farblosigkeit der Lösung reduziert.

---

24) H. Wyler, J. Chiovini, Helv.Chim.Acta 51, 1477 (1968).

3. Das Reaktionsgemisch wird sofort angesäuert, zur Trockne gebracht und der Rückstand mit Acetanhydrid-Pyridin acetyliert.

Wenn man von der Annahme ausgeht, daß sich Methyldopa-methylester bei diesen Reaktionen nicht anders als Dopa-methylester verhält, so dürfte folgendes Formelschema gelten:



Die Arbeitsweise in den drei Reaktionsphasen wurde durch folgenden Sachverhalt bestimmt:

1. Die oxidative Umwandlung des Methyldopa-methylesters in den Methyldopachrom-methylester bei pH 8 ist nach den halbquantitativen spektroskopisch-kinetischen Messungen der Oxidationsgeschwindigkeit von Dopa-methylester von WYLER und CHIOVINI [25] und HAWLEY und Mitarbeiter [26] innerhalb von 1 bis 2 Sekunden beendet.

---

25) H. Wyler, J. Chiovini, Helv. Chim. Acta 51, 1492 (1968).

26) M.D. Hawley, S.V. Tatawawadi, S. Piekarsky, R.N. Adams, J. Am. Chem. Soc. 89, 447 (1967).

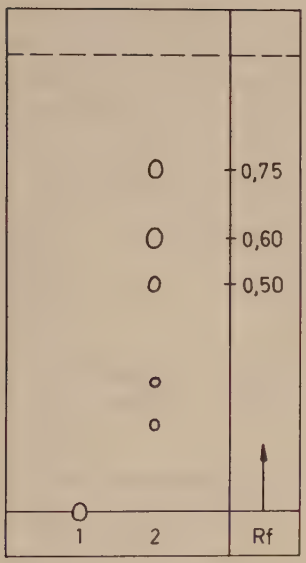
Voraussetzung hierfür ist allerdings die Einhaltung der Konzentrationsverhältnisse von etwa 0,01 M.

2. Der nach der Oxidation sich in Lösung befindliche Farbstoff (Methyldopachrom-methylester) zersetzt sich sehr schnell, wie dies das UV-Spektrum zeigt. Aus diesem Grund wurde das Reduktionsmittel rasch anschließend an die Oxidation zugegeben.
3. Das entstandene Reduktionsprodukt (Methylcyclodopa-methylester) muß möglichst rasch stabilisiert werden. Es muß angesäuert werden, um die Rückoxidation des Methylcyclodopa-methylesters zum roten Methyldopachrom-methylester durch Luftsauerstoff zu erschweren. Beispielsweise tritt bei pH 8 beim Abdampfen der Lösung erneut Rotfärbung auf.

Daher wurde zur Aufarbeitung des Reaktionsansatzes nach Oxidation, Reduktion und Acetylierung das Acetylierungsgemisch filtriert, der Salzrückstand mit Methylenchlorid gewaschen und die vereinigte Lösung eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 N-HCl und Methylenchlorid zu gleichen Teilen aufgenommen, der Methylenchloridextrakt mit $NaHCO_3$-Lösung und Wasser neutral gewaschen und eingedampft. Das Dünnschichtchromatogramm des Rückstandes (Abb. 7) zeigt bei Rf = 0,60 einen Hauptfleck, ungleich schwächere Flecke bei Rf = 0,75, Rf = 0,50, Rf = 0,30 und Rf = 0,20.

Der Rückstand wurde säulenchromatographisch über Kieselgel mit Methylenchlorid / Methanol aufgetrennt und die Substanzen mit Rf = 0,75 und Rf = 0,60 isoliert.

Ein Massenspektrum der Substanz mit Rf = 0,75 zeigt einen Molekularpeak bei m/e = 256. Durch 7 weitere Fragmentpeaks bei m/e = 32, 64, 96, 128, 160, 192 und 224 läßt sich die Substanz mit Rf = 0,75 als Schwefel aus dem Natriumdithionit identifizieren.



1 = Methyldopa-methylester

2 = Rohprodukt nach Oxidation, Reduktion und Acetylierung

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Methylenchlorid / Methanol (95+5)
Laufhöhe:	10 cm
Detektion:	UV-Licht

Abb. 7: Dünnschichtchromatogramm des Rohprodukts

Die Substanz mit Rf = 0,60 hatte einen Schmelzpunkt von 110 °C und wurde spektroskopisch untersucht:

UV-Spektroskopie

Methyldopa (Abb. 45):	max.	279 nm:	lg ε 3.45
Substanz Rf = 0,60 (Abb. 8):	max. I	246 nm:	lg ε 3.92
	max. II	304 nm:	lg ε 3.55

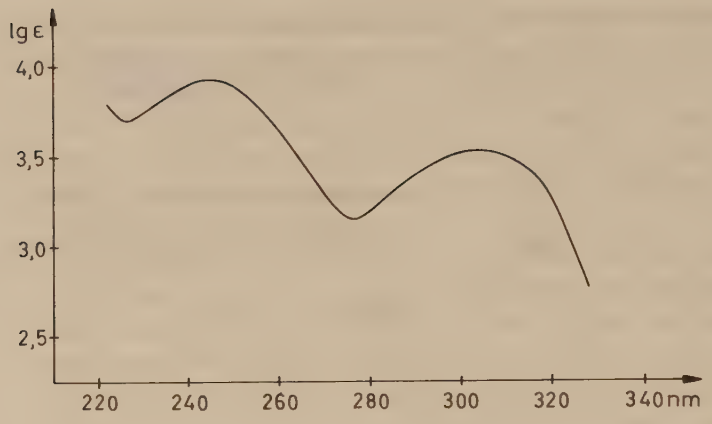


Abb. 8: UV-Spektrum der Substanz Rf = 0,60, gemessen in Methanol

IR-Spektroskopie

Das Spektrum von Methyldopa (Abb. 9), das zum Vergleich herangezogen wurde, besitzt einen breiten Bandenbereich von 3.500 - 2.800 cm^{-1}. Er wird hervorgerufen durch die H-Brücken der phenolischen OH-Gruppen in o-Stellung und durch die COOH-Gruppe. In diesem Bereich sind auch die Absorptionsbanden der N-H-Valenzschwingungen (NH_2- bzw. NH_3^+-Gruppe) lokalisiert (3.130 - 3.030 cm^{-1} [27]) bzw. 3.500 - 3.300 cm^{-1}). Während diese Banden beim Methyldopa durch die O-H-Valenzschwingungen verdeckt sind, ist im Spektrum der Substanz Rf = 0,60 (Abb. 10) eine Doppelbande bei 3.400 bzw. 3.410 cm^{-1} zu erkennen, da veresterte OH-Gruppen in diesem Bereich nicht absorbieren. Eine Bande in diesem Bereich ist typisch für die Indol-NH-Schwingung.

---

27) D.H. Williams, I. Fleming: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung. 3. Auflage. Verlag G. Thieme, Stuttgart 1975. S. 56.

Weist das Spektrum von Methyldopa eine Absorptionsbande bei 1.610 - 1.630 cm^{-1} auf, die von der $-COO^{-}$-Gruppe herrührt, so zeigt das Produkt eine Esterbande bei 1.720 cm^{-1}. Zusätzlich fällt bei 1.770 cm^{-1} die Phenylesterbande auf.

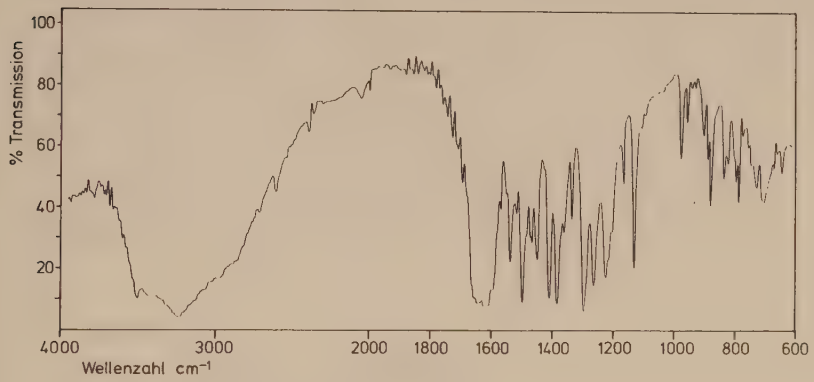


Abb. 9: IR-Spektrum von Methyldopa

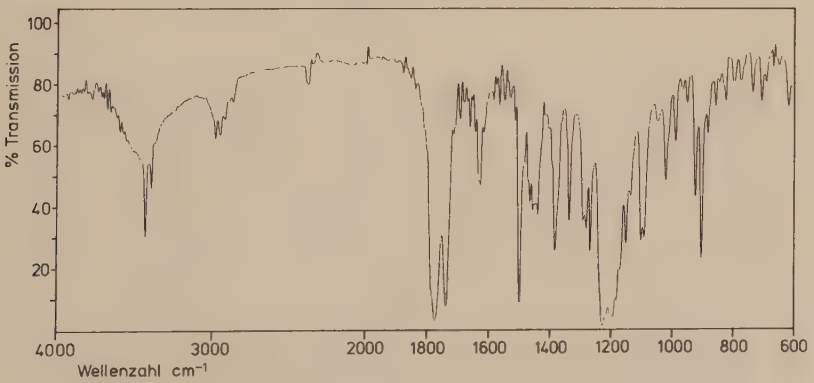
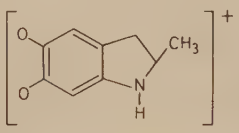


Abb. 10: IR-Spektrum von Produkt Rf = 0,60

Massen-Spektroskopie

Das Massenspektrum (Abb. 11) zeigt einen Massenpeak von 307. Die Massendifferenz 43 (CH_3CO) tritt zweimal auf (zwischen m/e 307 und 264 und 264 und 221). M-59 (Abspaltung von $COOCH_3$) liegt zwischen m/e 221 und 162. Der 100-Prozent-Peak bei m/e 162 dürfte von folgendem Fragment herrühren:



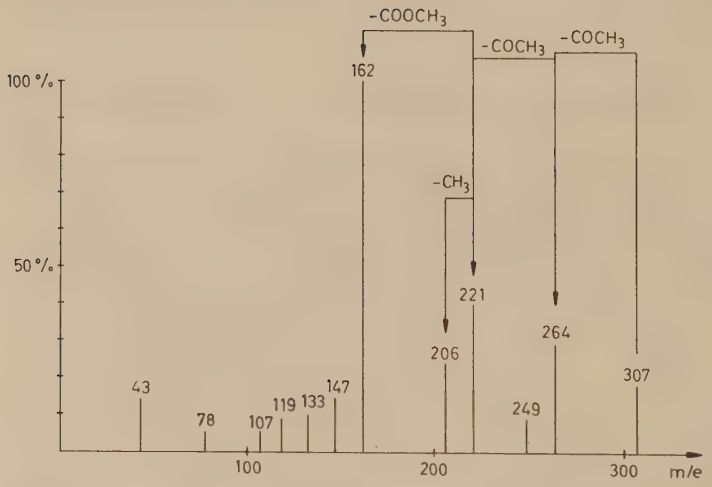
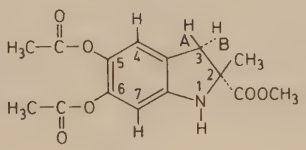


Abb. 11: Massen-Spektrum der Substanz Rf = 0,60
(70 eV, Probentemperatur 25 °C, Ionenquelle 250 °C)

NMR-Spektroskopie

Vergleicht man das NMR-Spektrum der Substanz (Abb. 12) mit dem Spektrum von Methyldopa (Abb. 13), so fällt auf, daß das Multiplett der aromatischen Protonen (δ = 6,65 ppm) beim Methyldopa im Spektrum der Substanz Rf = 0,60 nicht mehr vorhanden ist. Das Spektrum der Substanz zeigt lediglich noch zwei Einzelsignale bei δ = 6,41 ppm und 6,81 ppm, in einem Bereich, in dem aromatische Protonen in Resonanz treten. Anhand folgender Struktur, die auch aufgrund der IR- und Massen-Spektroskopie wahrscheinlich ist, kann das NMR-Spektrum eindeutig interpretiert werden:



Diacetylmethylcyclodopa-methylester

Das Singulett von H-C(7) erscheint unter der Feldbeeinflussung der benachbarten NH-Gruppe bei tieferem Magnetfeld (δ = 6,81 ppm) als dasjenige von H-C(4) (δ = 6,41 ppm) [28].

Bei δ = 3,75 tritt das Singulett der 3 Protonen der Methylestergruppierung auf. Die 6 Protonen der beiden Acetylgruppen am Aromaten erscheinen bei δ = 2,22, während die Protonen der Methylgruppe lediglich nach δ = 1,56 verschoben sind. Die geminalen Wasserstoffatome am C(3), die durch nicht frei drehbare Bindungen gebunden sind, bilden ein Doppeldublett bei δ_A = 3,56 und δ_B = 2,93 (J_{AB} = 16 Hz).

---

28) H. Wyler, J. Chiovini, Helv. Chem. Acta 51, 1483 (1968).

29) G. Rücker: Spektroskopische Methoden in der Pharmazie. Bd. II. Kernresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1976. S. 19

Das Proton am N hat eine chemische Verschiebung nach δ = 4,53 ppm erfahren.

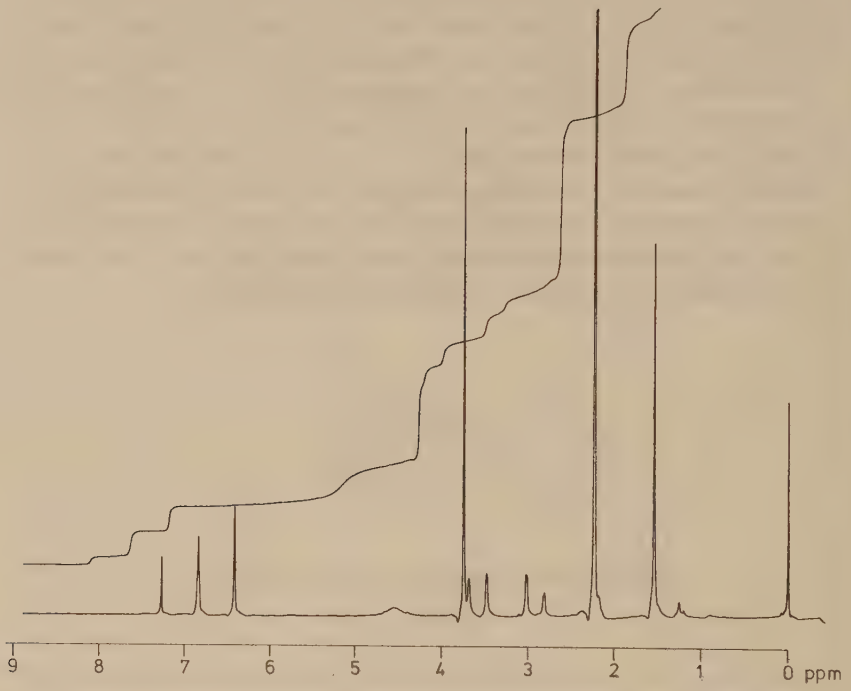


Abb. 12: NMR-Spektrum der Substanz Rf = 0,60
(Lösungsmittel: $CDCl_3$)

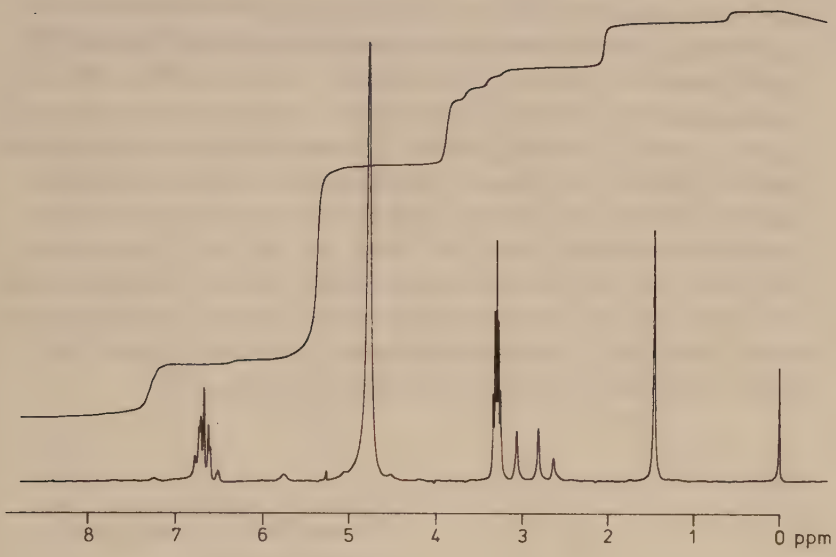


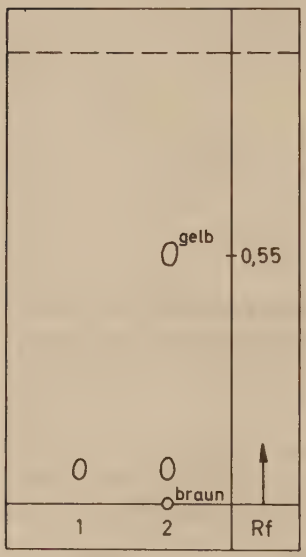
Abb. 13: NMR-Spektrum von Methyldopa
(Lösungsmittel: CD_3OD)

Eine weitere Bestätigung dafür, daß es sich bei der Substanz Rf = 0,60 um den Diacetylmethylcyclodopa-methylester handelt, ergab die Elementaranalyse.

Das Ergebnis überrascht, da Wyler und Chiovini bei der Acetylierung von Cyclodopa-methylester das Triacetylderivat erhielten. Daß die N-Acetylgruppe bei der Acetylierung des Methylcyclodopa-methylesters, die nach den Bedingungen von Wyler und Chiovini durchgeführt wurde, nicht eingeführt wurde, läßt sich eventuell auf eine sterische Hinderung durch die zusätzliche benachbarte Methylgruppe zurückführen.

e) Semicarbazonbildung des roten Farbprodukts

Die frisch durch Oxidation von Methyldopa-methylester mit $K_3[Fe(CN)_6]$ in Phosphatpuffer pH 8 hergestellte Farbstofflösung wurde mit Butanol extrahiert. Nach Trocknen des Butanolauszugs mit Na_2SO_4 wurde diese Lösung stark eingeengt. Diese eingeengte Lösung wurde zu einem wasserfreien ethanolischen Extrakt von Semicarbazidhydrochlorid und Natriumacetat gegeben und erhitzt. Das Dünnschichtchromatogramm der Reaktionslösung (Abb. 14) zeigt bei Rf = 0,55 einen gelben Fleck. Diese Substanz wurde durch Säulenchromatographie mit Kieselgel und Chloroform/Methanol (80/20) als Elutionsmittel isoliert. Tiefrote kubische Kristalle konnten durch Kristallisieren aus Ethanol gewonnen werden.



1 = Alkoholischer Extrakt aus Semicarbazid-HCl und Na-Acetat

2 = Reaktionslösung

Adsorbens: Kieselgel F_{254} 'Merck'

Fließmittel: Chloroform/Methanol (80+20)

Laufhöhe: 10 cm

Detektion: UV-Licht

Abb. 14: Schematisches Dünnschichtchromatogramm der Semicarbazid-Reaktionslösung

Das UV-Spektrum der Semicarbazonverbindung (Abb. 15) zeigt Maxima bei 224 nm und 355 nm. Diese Maxima sind nahezu identisch mit den in der Literatur [30] beschriebenen vom Adrenochrom-monosemicarbazon, die bei 226 nm und 354 bis 357 nm liegen.

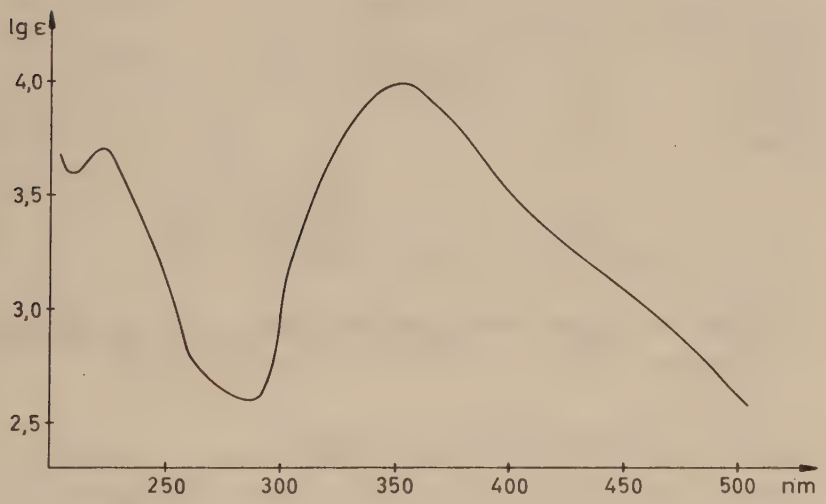


Abb. 15: UV-Spektrum des Semicarbazon in Methanol
($C = 1 \times 10^{-4}$ Mol/l)

λ max I: 224 nm (lg ε 3.7)
λ max II: 355 nm (lg ε 3.0)

Das IR-Spektrum (Abb. 16) weist einen breiten Bandenbereich von 3.450 bis 3.100 cm^{-1} auf. In diesem Bereich treten die Valenzschwingungen von Amin-N-H und Amid-N-H auf. Bei 1.650 cm^{-1} ist die C=O-Valenzschwingung von primären Amiden

---

30) F. Ramisez, P. von Ostwalden, J. Org. Chem. 20, 1676 (1955). R.A. Heacock, Chem. Rev. 59, 181 (1959).

zu erkennen. Hinter den zwei sich überlagernden Banden bei 1.680 bis 1.700 cm^{-1} könnte sich die C=N-Valenzschwingung und die Amid I-Bande von sekundären Amiden verbergen, während die Amid II-Bande bei 1.550 cm^{-1} zu erkennen ist. Bei 1.730 cm^{-1} absorbiert die veresterte Carboxylgruppe.

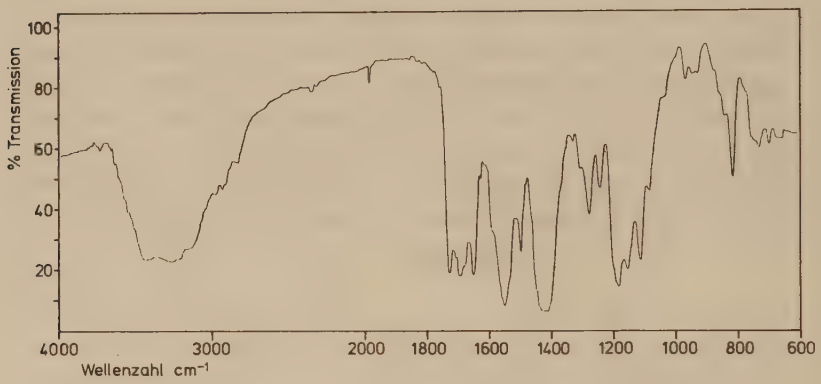
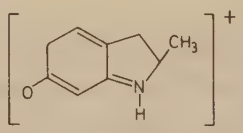


Abb. 16: IR-Spektrum des Semicarbazon

Das Massenspektrum (Abb. 17) zeigt einen Peak bei m/e 278, von dem ausgehend die Abspaltung von $-CO-NH_2$, N-NH, $-COOCH_3$ und CH_3 aufgrund von Fragmentpeaks verfolgt werden kann. Der 100-Prozent-Peak bei m/e 146 ist wohl durch folgendes Fragment verursacht:



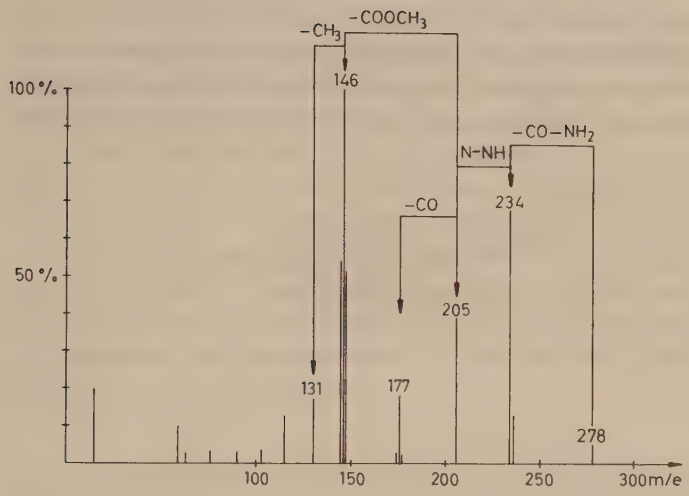
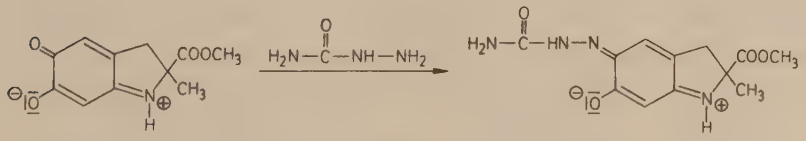


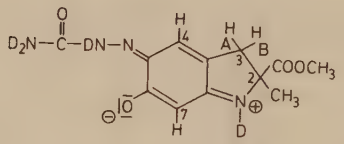
Abb. 17: Massenspektrum des Semicarbazonderivats (Probentemperatur 135 °C)

Die Tatsache, daß bei der Umsetzung des roten Farbproduktes (Methyldopachrom-methylester) mit Semicarbazid Methyldopachrom-monosemicarbazon-methylester (MG 278) entstanden ist, darf als Beweis dafür gelten, daß die zwitterionische Struktur dem chemischen Verhalten bei dieser Reaktion besser entspricht:



Löst man das Semicarbazonderivat in CD_3OD, so zeigt das NMR-Spektrum (Abb. 18) lediglich die Protonen, die nicht durch CD_3OD ausgetauscht werden können. Dies heißt, daß

hiermit mit Ausnahme des fehlenden Signals von gleichsam das NMR-Spektrum von Methyldopachrom-methylester vorliegt. Denn die Protonen der Semicarbazon-Gruppe werden durch CD_3OD wie folgt ausgetauscht und damit nicht erfaßt:



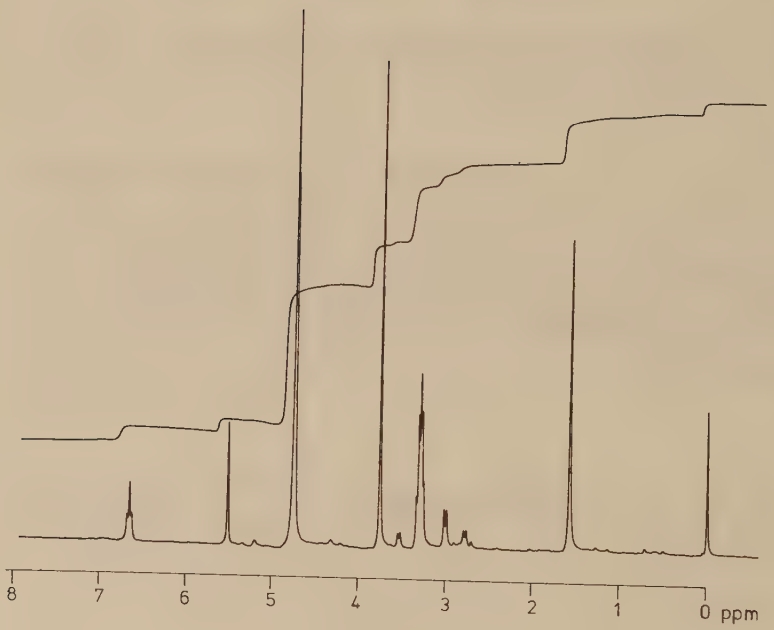


Abb. 18: NMR-Spektrum des Semicarbazonderivates in CD_3OD

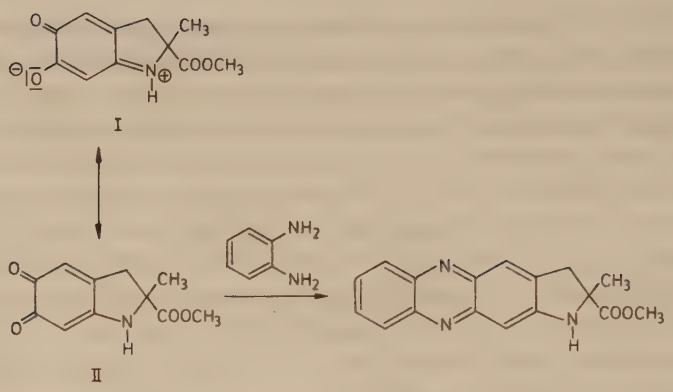
Das Singulett bei δ = 5,50 ppm ist von H-C(7) verursacht. H-C(4) fällt bei δ = 6,62 ppm durch ein ineinander geschobenes Doppeldublett, das wie ein Triplett aussieht, auf. Diese Aufspaltung beruht auf der longrange-Kopplung mit den zwei Protonen am C(3). Die geminalen Wasserstoffatome am C-3 bilden durch die longrange-Kopplung mit H-C(4) ein jeweils in sich aufgespaltenes Doppeldublett bei δ_A = 3,43 und δ_B = 2,87 ppm (J_{AB} = 16 Hz). Bei δ = 3,75 ppm tritt das Singulett der 3 Protonen der Methylestergruppierung auf. Die Protonen der Methylgruppe am C-2 sind nach δ = 1,56 ppm verschoben. Die Signale bei δ = 4,68 und 3,28 ppm sind von CH_3OH in CD_3OD verursacht.

f) Dinitrophenylhydrazonbildung des roten Farbprodukts.
Die frisch hergestellte 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung in H_2SO_4 und Ethanol wird mit dem auf etwa 3 ml eingeengten Butanolextrakt aus der Farbstofflösung versetzt. Dünnschichtchromatographisch konnte ein entstandenes gelbes Produkt im Reaktionsgemisch nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich um das Dinitrophenylhydrazon des Methyldopachrom-methylesters.

g) Umsetzung mit o-Phenylendiamin

Dem roten Farbstoff Methyldopachrom-methylester kommt aufgrund der Reaktion mit Semicarbazid zum Monosemicarbazon bevorzugt die zwitterionische Form I zu. Inwieweit auch die Verbindung in der im Gleichgewicht zu Form I stehenden o-Chinon-Form II reagiert, sollte am Reaktionsverhalten mit o-Phenylendiamin überprüft werden.

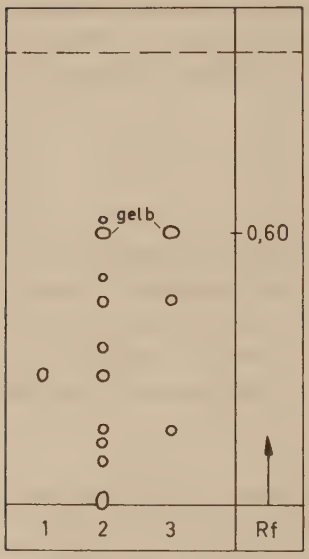
Ein Butanolauszug aus der Reaktionslösung von Methyldopamethylester mit $K_3[Fe(CN)_6]$ in Phosphatpuffer pH 8 wurde auf etwa 5 ml eingeengt. Nach Zusatz einer äquivalenten Menge o-Phenylendiamin wurde 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Das Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsgemi-



I

II

sches (Abb. 19) zeigt bei Rf = 0,60 einen gelben Fleck, der unter UV-Licht grün fluoresziert. Mit präparativer Schichtchromatographie wurde versucht, diese gelbe Substanz zu



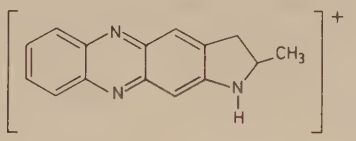
1 = o-Phenylendiamin
2 = Reaktionsansatz nach Erhitzen
3 = Mit präparativer Schichtchromatographie gereinigtes Produkt

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Chloroform/Methanol (9 : 1)
Laufhöhe:	10 cm
Detektion:	1. UV-Licht: Der gelbe Fleck bei Rf = 0,60 fluoresziert grün
	2. Besprühen mit 0,1 n HCl: Fleck Rf = 0,60 wird rot

Abb. 19: Dünnschichtchromatogramm der Umsetzung mit o-Phenylendiamin

isolieren. Allerdings ergab ein Dünnschichtchromatogramm des Eluats wiederum eine Reihe von Flecken. Eine erneute chromatographische Trennung führte zu demselben negativen Ergebnis. Daraus muß der Schluß gezogen werden, daß das Produkt sich auf Kieselgel zersetzt.

Das Massenspektrum (Abb. 20) zeigt einen Molekül-Peak von m/e = 293, was der Molekülmasse des oben angegebenen Phenazins entspricht. Der 100-Prozent-Peak liegt bei m/e 234, was folgendem Fragment entsprechen dürfte:



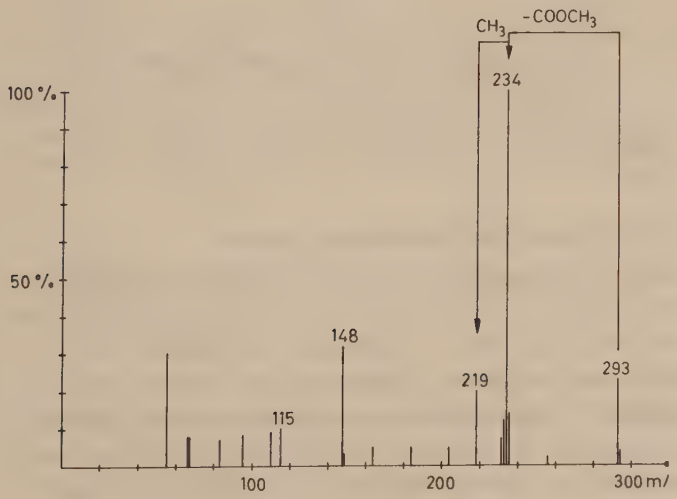


Abb. 20: Massenspektrum des Phenazinderivates (Einlaßtemperatur: 65 °C)

Das Elektronenspektrum des Phenazinderivates (Abb. 21) in Methanol zeigt Maxima bei 455, 367 und 275 nm. Die gelb-orange methanolische Lösung schlägt bei Zugabe von Mineralsäuren nach tiefrot um. Diese bathochrome Verschiebung drückt sich in folgenden neuen Maxima bei 502, 380 und 282 nm aus. Diese Beobachtung machte bereits HAMACHER [31] beim Phenazin des Rubreserins.

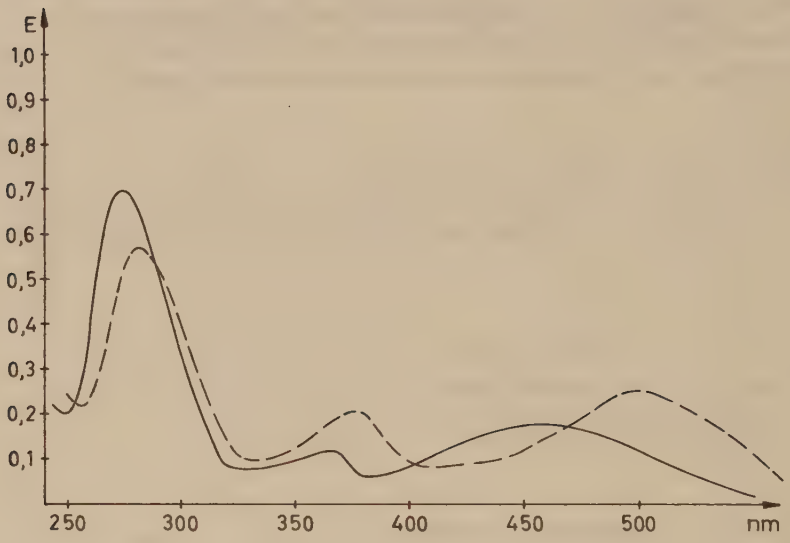


Abb. 21: UV-Spektrum des Phenazinderivates

——— = in Methanol ----- = in Methanol/HCl

Mit der Umsetzung von Methyldopachrom-methylester mit o-Phenylendiamin zu einem Phenazin konnte gezeigt werden, daß der rote Farbstoff zum Teil in der o-Chinon-Form vorliegt, da er mit beiden NH_2-Gruppen des Reagens reagiert.

---

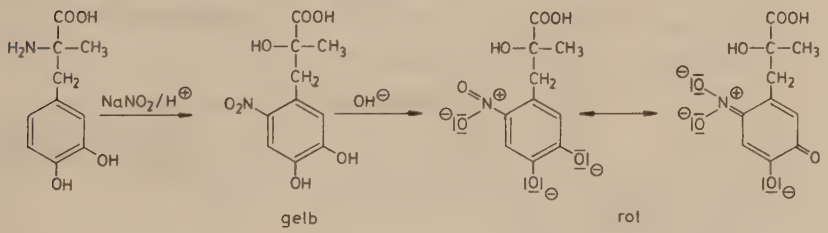
31) H. Hamacher, Diss. Tübingen 1967.

Allerdings darf aufgrund der sehr geringen Ausbeute geschlossen werden, daß doch die zwitterionische Form I überwiegt. Zudem ist das Phenazinderivat sehr labil.

2. Zur Reaktion von Methyldopa mit salpetriger Säure

Versetzt man eine Methyldopa-Lösung in 0,5 N-HCl mit Natriumnitrit im Überschuß, so tritt unter Gasentwicklung eine Gelbfärbung auf. Nach Zusatz von wenigen Tropfen 10 proz. Lauge schlägt die Gelbfärbung augenblicklich nach Rotbraun um.

Folgender Reaktionsablauf ist zu vermuten:



Da primäre aliphatische Amine bei der Einwirkung von salpetriger Säure in die entsprechenden Alkohole übergehen, ist ein oxidativer Ringschluß zu Methyldopachrom nicht möglich. Von daher ist auszuschließen, daß die Rotbraun-Färbung auf der Bildung von Methyldopachrom beruht.

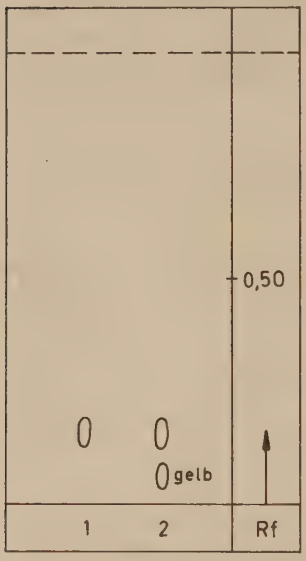
ROTH und VOLKMANN [32] konnten bei der Reaktion von Adrenalin mit $NaNO_2$/HCl zeigen, daß neben Adrenochrom auch hier

---

32) H.J. Roth, U. Volkmann, Arch. Pharm. (Weinheim) 302, 450 (1969).

6-Nitroadrenalin entsteht, das sich auf Zusatz von Lauge rot färbt. Die Zunahme der Farbintensität erklären sie mit den oben wiedergegebenen mesomeren Grenzformeln.

Das Dünnschichtchromatogramm (Abb. 22) der Methyldopa-$NaNO_2$-HCl-Lösung zeigt bei Rf = 0,10 einen gelbgefärbten Fleck, der beim Besprühen mit NaOH nach rot umschlägt. Versuche, diesen gelben Farbstoff mit Chloroform, Butanol oder Essigsäureethylester auszuschütteln, schlugen fehl.



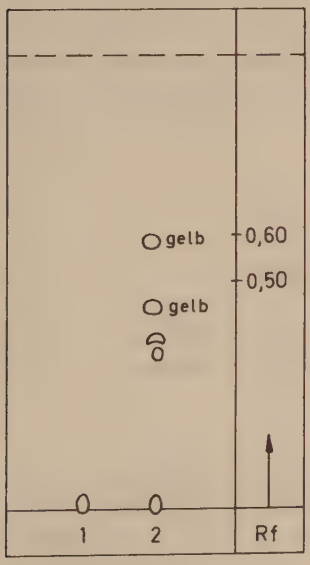
1 = Methyldopa
2 = Reaktionslösung

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Butanol/Eisessig (90+10) (wassergesättigt)
Laufhöhe:	10 cm
Detektion:	1. UV-Licht 2. Fleck Rf = 0,10 nach Besprühen mit NaOH rot

Abb. 22: Dünnschichtchromatogramm der Methyldopa-$NaNO_2$-HCl-Lösung

Da auch chromatographische Trennverfahren wegen der Polarität der Verbindung nicht zum Erfolg führten, führten wir zum einen die Reaktion anstelle mit Methyldopa mit dem Methylester aus, zum anderen acetylierten wir das entstandene gelbe Farbprodukt. Dazu wurde eine Lösung von Methyldopa-

methylester in 0,5 N-HCl mit $NaNO_2$ im Überschuß versetzt. Es trat N_2-Entwicklung auf. Die gelbgefärbte Lösung wurde zur Trockne eingeengt, der Rückstand in Acetanhydrid/Pyridin stehen gelassen. Nach Filtrieren und Nachwaschen des Filtrierrückstandes mit Methylenchlorid wurde zur Trockne eingedampft. Nach Versetzen des Rückstandes mit 0,5 N-HCl/ Methylenchlorid zu gleichen Teilen wurde die Methylenchloridfraktion neutral gewaschen und zur Trockne im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde dünnschichtchromatographisch (Abb. 23) untersucht. Der Fleck Rf = 0,60 ergab nach Besprühen mit NaOH innerhalb 1 Minute eine tiefe Rotfärbung.



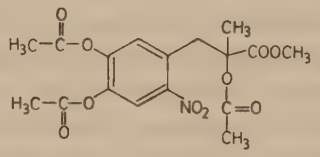
1 = Methyldopa-methylester
2 = Substanzgemisch nach Acetylieren

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Chloroform/Methanol (9 + 1)
Laufhöhe:	10 cm
Detektion:	1. UV-Licht 2. Besprühen mit 10 proz. NaOH-Lösung

Abb. 23: Dünnschichtchromatogramm des gelben Farbproduktes nach Acetylieren

Das Substanzgemisch wurde mit präparativer Schichtchromatographie (Fließmittel: Chloroform / Methanol 9+1) aufgetrennt und die Substanz mit Rf = 0,60 isoliert. Nach dem

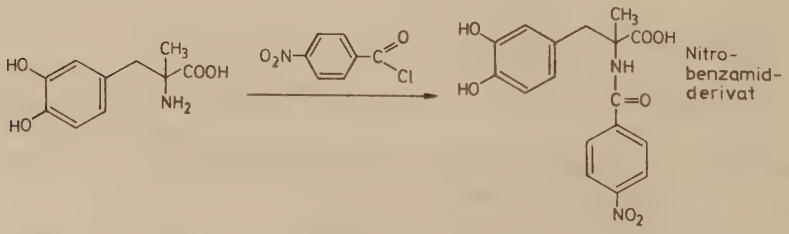
Massenspektrum hat die Substanz eine Molekülmasse von 397. Somit könnte sie folgende Struktur besitzen:



Daß ein Triacetylprodukt bei der Acetylierung entstanden ist, beweist die obige Annahme, daß die NH_2-Gruppe bei der Reaktion mit $NaNO_2$/HCl über eine unbeständige Diazoniumverbindung durch eine OH-Gruppe ersetzt wird. Darüber hinaus wird die nach Roth und Volkmann vermutete Einführung einer NO_2-Gruppe bestätigt.

3. Zur Reaktion mit Nitrobenzoylchlorid

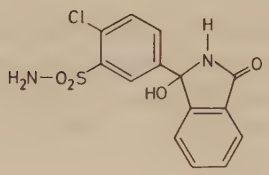
Bekanntlich lassen sich Aminosäuren dadurch näher charakterisieren, daß man mit Nitrobenzoylchlorid umsetzt.



Da durch diese Umsetzung die NH_2-Gruppe blockiert wird, ist unter oxidativen Bedingungen ein Ringschluß zu C-6 erschwert. Der Entwurf einer Monographie für das Europäische

Arzneibuch läßt in einer Identitätsreaktion eine wässrige Methyldopa-Lösung mit Pyridin und Nitrobenzoylchlorid versetzen und erhitzen. Nach Zugabe von Natriumcarbonat-Lösung und Schütteln entsteht eine gelb- bis gelbbraungefärbte Lösung.
Dieselbe Färbung trat auch auf, wenn die Reaktion mit Brenzkatechin durchgeführt wurde. Bei der UV-spektroskopischen Untersuchung zeigen beide Reaktionsansätze eine ähnliche Absorption im Bereich von 400 bis 500 nm.

VII. Zur Analytik von Chlortalidon



Die Brit. 73 läßt die Identität von Chlortalidon durch UV- und IR-Spektren, durch Nachweis der Sulfonamidgruppe nach Behandlung mit Alkali und Oxidation als Sulfat und durch die intensive gelbe Färbung einer Lösung in konz. Schwefelsäure sichern. Diese Gelbfärbung tritt, wie wir feststellten, auch auf, wenn Chlortalidon mit Alkaloidfarbreagenzien, die konz. Schwefelsäure enthalten, versetzt wird (Tab. 5 und 6).

1. Gelbfärbung in konz. Schwefelsäure

Gibt man konz. Schwefelsäure zum farblosen Chlortalidon, so färbt sich die Schwefelsäurelösung augenblicklich stark gelb. Diese Gelbfärbung ist beständig, wie das UV-Spektrum einer Lösung nach 12 Stunden zeigt (Abb. 24: punktierte Linie). Die Maxima bei 388 und 350 nm bleiben im Vergleich zu einer 10 Minuten nach Herstellung gemessenen Lösung sowohl hinsichtlich Wellenlänge als auch Intensität unverändert. Bei 275 nm, dem Minimum der Kurve, ist jedoch ein Anstieg der Extinktion zu erkennen. Erhitzt man die Schwefelsäurelösung, so tritt ein neues Maximum bei 300 nm auf (gestrichelte Linie).

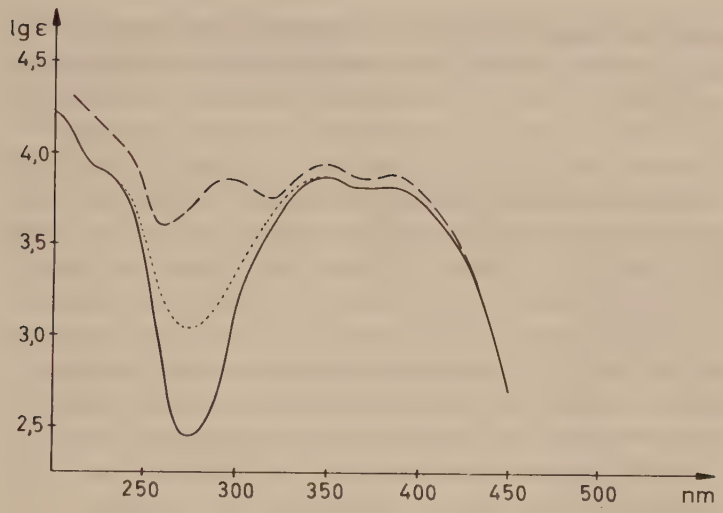


Abb. 24: UV-Spektren von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure

——— = gemessen 10 Min. nach Herstellung

····· = gemessen 12 Std. nach Herstellung

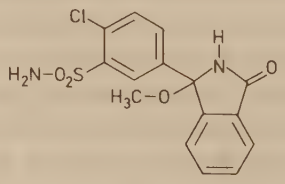
----- = gemessen nach 3-stündigem Erhitzen bei 80 °C

(Das UV-Spektrum von Chlortalidon in Methanol zeigt Maxima bei 227, 274 und 282 nm.)

a) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Reaktionslösung

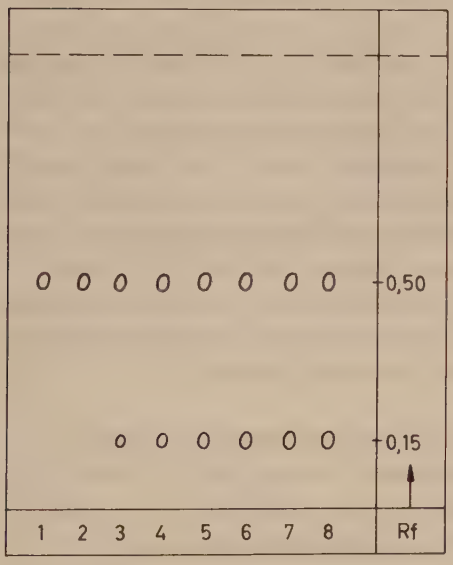
Gibt man zu der gelbgefärbten Chlortalidon-Schwefelsäurelösung in kleinen Anteilen Wasser, so tritt zuerst Entfärbung ein. Gibt man weiter Wasser hinzu, so fällt ein weisses Produkt aus. Diese Substanz wurde dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb. 25). Des weiteren wurden Chlortalidon-Schwefelsäurelösungen verschieden lang bei Raumtemperatur stehengelassen. Diese Lösungen wurden auf Eis gegossen (die Gelbfärbung verschwand augenblicklich) und die

dabei ausfallende weiße Substanz dünnschichtchromatographisch untersucht. Analog wurde vorgegangen bei einer Lösung von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure, die zuvor 3 Stunden bei 80 °C erhitzt worden war. Wie das Dünnschichtchromatogramm (Abb. 25) zeigt, besteht die ausgefallene Substanz bei der frisch bereiteten und sofort auf Eis gegossenen Lösung ausschließlich aus Chlortalidon (Rf = 0,50). Läßt man jedoch eine Zeit stehen, so zeigt das Dünnschichtchromatogramm einen neuen Fleck bei Rf = 0,15. Der Anteil der Substanz mit dem Rf-Wert 0,15 steigt mit Dauer des Stehenlassens. Bei der durch Wasserzugabe ausgefällten Substanz und bei dem Produkt von dem Reaktionsansatz, der längere Zeit bei Raumtemperatur stehengelassen worden war, übertrifft der neu auftretende Fleck bei Rf = 0,15 den von Chlortalidon an Größe. Ether- und Chloroform-Extrakte der einzelnen verdünnten wässrigen Lösungen, aus denen der Niederschlag abfiltriert worden war, zeigten bei der dünnschichtchromatographischen Untersuchung die gleichen Flecke wie die jeweiligen ausgefallenen Produkte.
Die ausgefallenen Substanzen wurden abfiltriert und für die dünnschichtchromatographische Untersuchung in Chloroform gelöst. Verwendete man als Lösungsmittel Methanol, so trat ein neuer Fleck bei Rf = 0,65 auf, der sich wie Chlortalidon beim Besprühen mit konz. Schwefelsäure gelb färbt. Nach Isolierung mit präparativer Schichtchromatographie konnte dieses neu auftretende Produkt als Methylether des Chlortalidon identifiziert werden (durch Massenspektrum, Elementaranalyse und Schmelzpunkt - siehe Kap. X). Diese auffal-



Chlortalidon-methylether

lend große Reaktionsfähigkeit der tertiären OH-Gruppe des Chlortalidon wurde bereits von W. GRAF und Mitarbeiter beschrieben. [33)]



1 = Chlortalidon

2-6 = Produkt aus H_2SO_4-Reaktionsansatz, ausgefallen beim Gießen auf Eis:
2 = sofort nach Lösen des Chlortalidons in konz. Schwefelsäure
3 = nach 20 Minuten
4 = nach 3 Stunden
5 = nach 12 Stunden
6 = nach 36 Stunden

7 = ausgefallenes Produkt aus H_2SO_4-Ansatz nach 3 Stunden Erhitzen bei 80 °C

8 = ausgefallenes Produkt aus H_2SO_4-Ansatz durch Zugabe von Wasser

Adsorbens: Kieselgel F_{254} 'Merck'

Fließmittel: Chloroform/Methanol (70+30)

Laufhöhe: 10 cm

Detektion: 1. UV-Licht
2. Besprühen mit konz. H_2SO_4: Flecke mit Rf = 0,50 färben sich gelb an

Abb. 25: Schematisches Dünnschichtchromatogramm der ausgefallenen Produkte aus konz. H_2SO_4-Chlortalidon-Lösungen unter verschiedenen Bedingungen

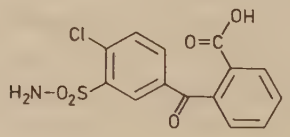
---

33) W. Graf, E. Girod, E. Schmid, W.G. Stoll, Helv. Chim. Acta 42, 1092 (1959).

b) Isolierung und Identifizierung des H_2SO_4-Abbauproduktes

Das ausgefallene Produkt aus einer Lösung in Schwefelsäure, die 3 Stunden bei 80 °C gehalten worden war, wurde mit präparativer Schichtchromatographie aufgetrennt und die Substanz mit Rf = 0,15 isoliert. Dünnschichtchromatographisch rein konnte diese Substanz auch auf folgende Weise gewonnen werden: Chlortalidon wurde möglichst konzentriert in konz. Schwefelsäure gelöst und nach 3-stündigem Erhitzen auf 80 °C auf eine größere Menge Eis gegossen, wobei nur sehr wenig Substanz ausfiel. Die nunmehr etwa 5 proz. Schwefelsäurelösung wurde filtriert und 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, wobei sich sternförmige Kristalle bildeten. Nach Abfiltrieren konnten diese Kristalle durch mehrmaliges Umkristallisieren aus Methanol/Wasser bis zur dünnschichtchromatographischen Reinheit gebracht werden.

Der Schmelzpunkt der Substanz mit dem Rf-Wert = 0,15 von 223 °C ergab einen ersten Hinweis darauf, daß es sich um die von W. GRAF und Mitarbeiter beschriebene [34] 3'-Sulfamyl-4'-chlor-benzophenon-2-carbonsäure handelt.



3'-Sulfamyl-4'-chlor-benzophenon-2-carbonsäure

W. Graf und Mitarbeiter hatten diese Säure durch partielle

---

34) W. Graf, E. Girod, E. Schmid, W.G. Stoll, Helv. Chim. Acta 42, 1097 (1959).

alkalische Verseifung von Chlortalidon erhalten. Die von ihnen für diese Säure angegebenen Reaktionen wie Gelbfärbung in konz. H_2SO_4 und rotviolette Färbung beim Zugeben von wenig α-Naphthol waren auch für unsere Substanz positiv.

Das UV-Spektrum der Substanz, gemessen in Methanol, zeigt ein Maximum bei 255 nm (Abb. 26). Dies stimmt überein mit den Angaben von W. Graf und Mitarbeiter, die für eine ganze Reihe von Benzophenonderivaten UV-Maxima zwischen 250 und 260 nm nennen, für das oben in der Strukturformel angegebene Benzophenoncarbonsäurederivat berichten sie ein Maximum von 255 nm.

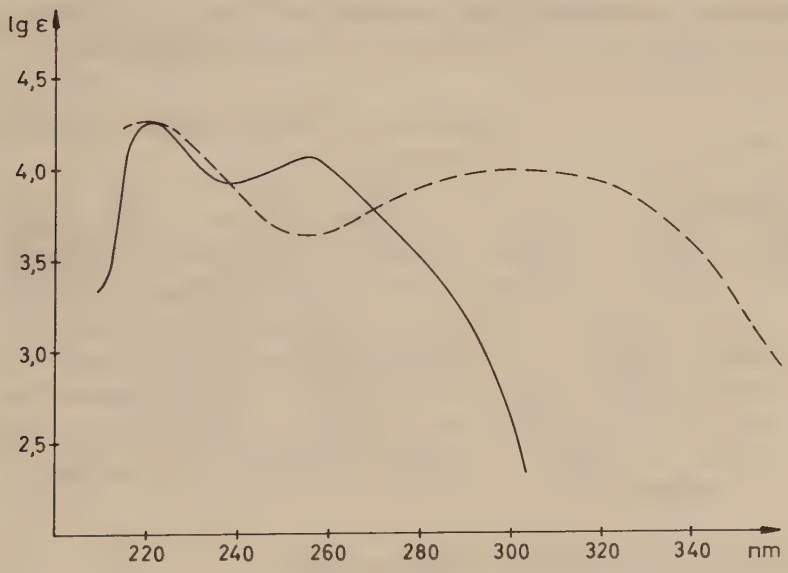


Abb. 26: UV-Spektrum der Substanz Rf = 0,15

——— = gemessen in Methanol

– – – – – = gemessen in konz. H_2SO_4

Mißt man die Substanz in konz. Schwefelsäure, so verschiebt sich das Maximum von 255 zu 300 nm. Dieses Maximum tritt im UV-Spektrum von Chlortalidon in Schwefelsäure (Abb. 24) nach Erhitzen auf. Dies deutet darauf hin, daß die Substanz Rf = 0,15 das wesentliche Abbauprodukt in konz. Schwefelsäure darstellt.

Das IR-Spektrum (Abb. 27) liefert weitere Hinweise dafür, daß es sich bei der in konz. Schwefelsäure entstehenden Substanz um ein Benzophenoncarbonsäurederivat handelt. Das Signal im IR-Spektrum von Chlortalidon (Abb. 28) bei 1700 cm^{-1}, das von der Carbonylfunktion des γ-Lactamrings hervorgerufen wird [35], ist nach 1720 cm^{-1} verschoben. Dies deutet auf eine aromatische COOH-Gruppe hin. Die Bande bei 1650 cm^{-1} im Spektrum der Substanz Rf = 0,15, im Chlortalidon-Spektrum nicht vorhanden, ist typisch für die Keto-

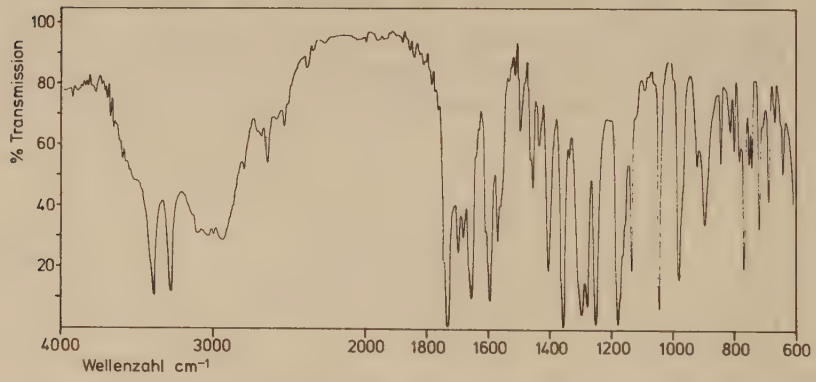


Abb. 27: IR-Spektrum der Substanz Rf = 0,15

35) L.J. Bellamy: Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution. 2. Aufl. Verlag D. Steinkopff, Darmstadt 1966. S. 163.

D.H. Williams, I. Flemming: Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung. 3. Aufl. Verlag G. Thieme, Stuttgart 1975. S. 65.

Gruppe von Benzophenonen. Die Schwingungen bei 3400 und 3290, bei 1350 und 1180 cm^{-1} kommen von der SO_2-NH_2-Gruppe und sind in beiden Spektren vorhanden.

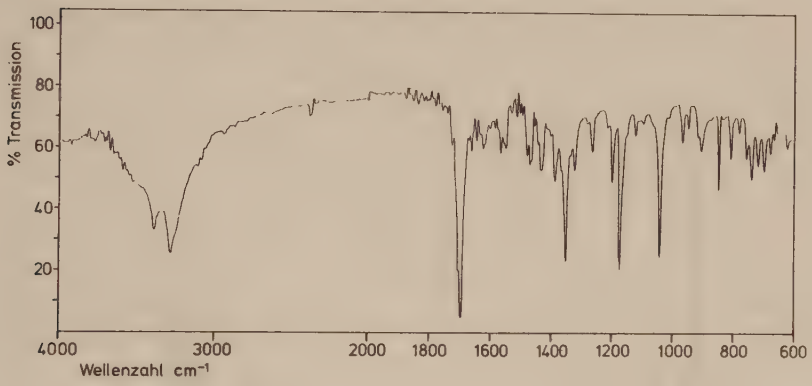


Abb. 28: IR-Spektrum von Chlortalidon

Vergleicht man das NMR-Spektrum der Substanz Rf = 0,15 (Abb. 29) mit dem von Chlortalidon (Abb. 30), so fällt auf, daß die Signale des Protons der tertiären OH-Gruppe (δ = 2,82 ppm) und der NH-CO-Gruppe (δ = 6,16 ppm) verschwunden sind. Unverändert geblieben ist das Multiplett der aromatischen Protonen (δ = 7,3 - 8,3 ppm) und das Singulett der zwei Protonen der SO_2-NH_2-Gruppe (δ = 6,75 ppm).

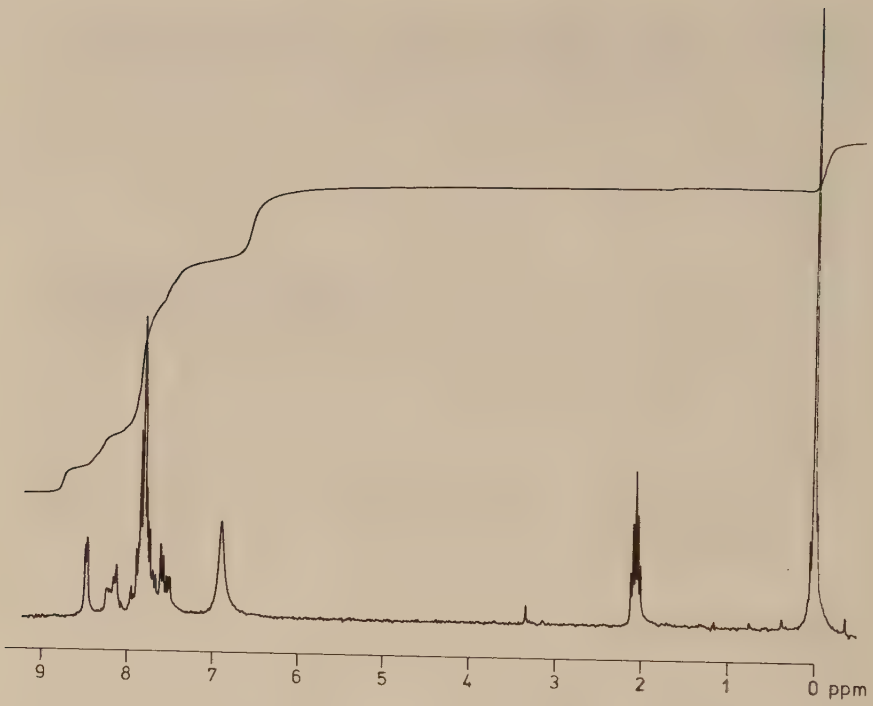


Abb. 29: NMR-Spektrum der Substanz Rf = 0,15, gemessen in CD_3COCD_3

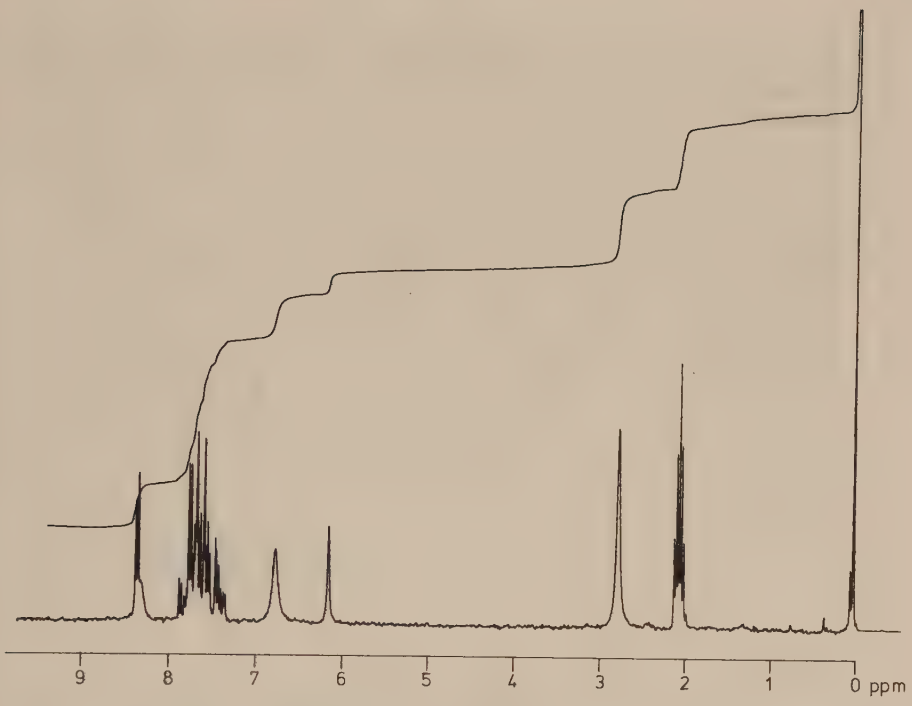


Abb. 30: NMR-Spektrum von Chlortalidon, gemessen in CD_3COCD_3

Das Massenspektrum der Substanz Rf = 0,15 (Abb. 31) zeigt den Molekülpeak bei m/e 339 mit der typischen Aufspaltung von Verbindungen mit Chlor- und Schwefel-Atomen. Vergleicht man es mit dem unter gleichen Bedingungen aufgenommenen Spektrum von Chlortalidon (Molekülpeak m/e 338), so sieht man wesentliche Unterschiede in der Fragmentierung. Während beispielsweise bei Chlortalidon der erste Fragmentierungsschritt in der Abspaltung von OH besteht, erkennt man im Spektrum der Substanz Rf = 0,15 die erste Fragmentierung in der Abspaltung der COOH-Gruppe, gefolgt von der Chlorabspaltung.

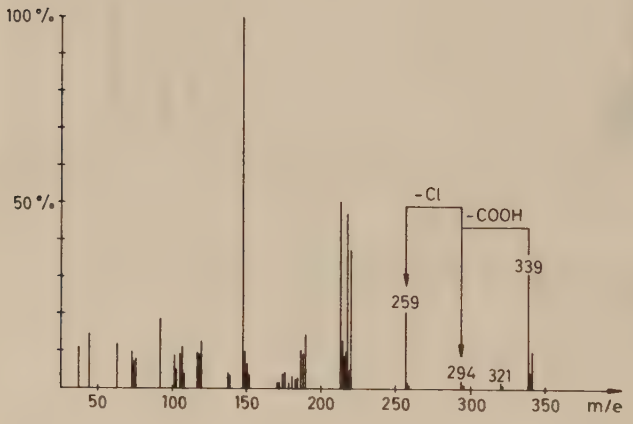


Abb. 31: Massenspektrum der Substanz Rf = 0,15
(Probentemperatur 155 °C)

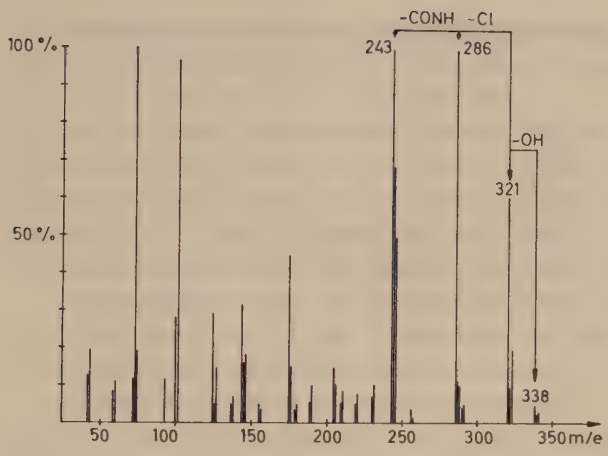
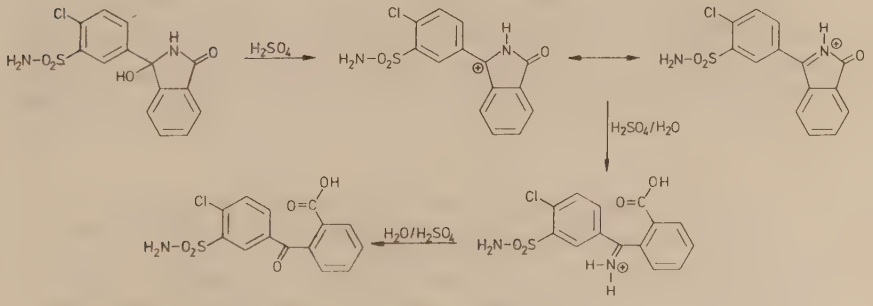


Abb. 32: Massenspektrum von Chlortalidon
(Probentemperatur 155 °C)

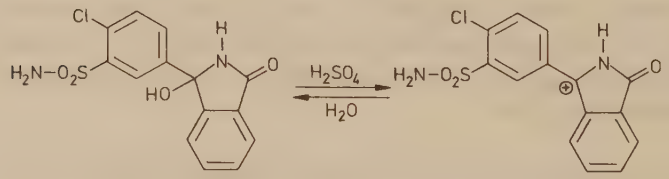
Eine weitere Bestätigung dafür, daß in konz. Schwefelsäure die von W. Graf und Mitarbeiter beschriebene 3'-Sulfamyl-4'-chlor-benzophenon-2-carbonsäure entstanden ist, ergab die Elementaranalyse.

Das Benzophenonderivat kann auf folgendem Wege entstanden sein:



c) Diskussion zur Entstehung der Gelbfärbung in konz. Schwefelsäure

Die augenblicklich entstehende Gelbfärbung, wenn man Chlortalidon mit konz. H_2SO_4 versetzt, hat primär nichts mit dem isolierten, nach einiger Zeit entstehenden Benzophenoncarbonsäurederivat zu tun. Wie Abbildung 24 zeigt, entsteht sehr langsam das neue Maximum bei 300 nm, das von dem Benzophenoncarbonsäurederivat oder einer Reaktionsvorstufe herrührt. Löst man Chlortalidon in H_2SO_4 und gießt die Lösung sofort auf Eis, so läßt sich dünnschichtchromatographisch kein neuer Fleck nachweisen. Dies und die sofortige Entfärbung bei Zugabe von Wasser spricht dafür, daß die Gelbfärbung von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure auf der Entstehung von Carbenium-Ionen beruht, die nur in konzentrierten starken Säuren beständig sind und sich bei Zugabe von Wasser in die Ausgangsverbindung zurückverwandeln. [36]



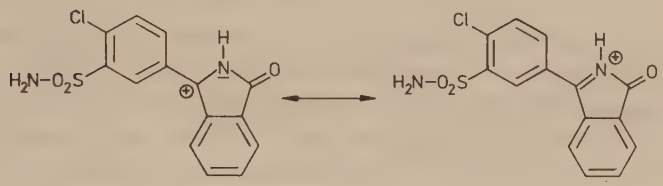
Unsubstituierte Diphenylcarbeniumionen absorbieren jedoch im allgemeinen im längerwelligen Bereich, so hat beispielsweise das Diphenylmethylcarbeniumion UV-Maxima bei 430 und 310 nm [37], Chlortalidon jedoch bei 388 und 350 nm. Daß das

---

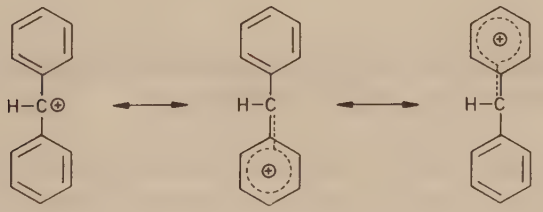
36) H. Volz, Chem. unserer Zeit 4, 101 (1970).
G.A. Olah: Carbokationen und elektrophile Reaktionen. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1974.

37) G.A. Olah, P. von R. Schleyer (Hrsg.): Carbenium Ions. Interscience Publishers, New York - London - Sidney 1968. S. 159.

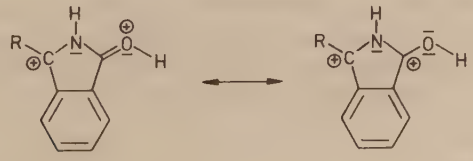
Maximum von Chlortalidon bei 388 nm um über 40 nm bei kürzerer Wellenlänge liegt, ist wahrscheinlich auf die Mesomerie mit dem Imoniumion zurückzuführen.



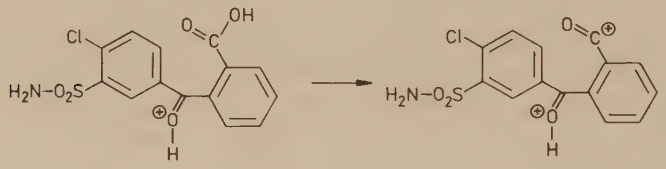
Von daher ist es nicht ohne weiteres möglich, das Maximum des Diphenylmethylcarbeniumions als Vergleich heranzuziehen, denn hier kann sich die positive Ladung frei über das Diarylsystem verteilen.



Zusätzlich dürfte eine Protonierung der Keto-Gruppe des γ-Lactamrings eine Rolle spielen. Da beispielsweise das Oxonium-Carbeniumion von Acetophenon, gemessen in H_2SO_4, bei 335 nm absorbiert, könnte das Maximum von 350 nm bei Chlortalidon auf der Protonierung der Keto-Gruppe beruhen.



In ähnlicher Weise läßt sich die Gelbfärbung des Benzophenoncarbonsäurederivates in konz. Schwefelsäure erklären (Abb. 26: λ_{max} = 300 nm). Es könnte auch ein Acylkation eine Rolle spielen [38]:



Sowohl das Acyl-Kation (UV-Maximum bei etwa 290 nm) [39] als auch die protonierte Ketogruppe (UV-Maximum bei 340 nm) [40] leisten einen Beitrag zum UV-Maximum des Benzophenoncarbonsäurederivates in konz. Schwefelsäure bei 300 nm.

2. Violettfärbung des Benzophenoncarbonsäurederivates mit α-Naphthol in konz. Schwefelsäure

Das Benzophenonderivat des Chlortalidon gibt in konz. Schwefelsäure bei Zugabe von wenig α-Naphthol sofort eine rotviolette Färbung. Setzt man einer Lösung von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure α-Naphthol zu, so entsteht diese Färbung nicht, die gelbe Farbe schlägt in eine rotviolette Färbung erst um, wenn Chlortalidon in konz. Schwefelsäure vorher kurz erhitzt wurde. Dies bedeutet, daß für die Entstehung der rotvioletten Farbe das durch Erhitzen sich bildende Benzophenoncarbonsäurederivat entscheidend ist.

---

38) G.A. Olah, C.U. Pittman, M.C.R. Symons, Electronic Spectra. In: Carbonium Ions. G.A. Olah, P. von R. Schleyer (Hrsg.). Interscience Publishers, New York - London - Sidney 1968. S. 153 - 208.

39) Ibid. S. 204.

40) Ibid. S. 208.

a) UV-spektroskopische Untersuchung des Reaktionsansatzes

Bei der UV-spektroskopischen Untersuchung eines Reaktionsansatzes des Benzophenoncarbonsäurederivates in konz. Schwefelsäure mit einem Überschuß an α-Naphthol (Abb. 33) zeigen sich zwei Maxima bei 510 nm und 318 nm mit einer Schulter bei 375 nm. Das Maximum bei 318 nm kann von nicht umgesetztem Benzophenoncarbonsäurederivat und überschüssigem α-Naphthol stammen (Benzophenoncarbonsäurederivat in konz. Schwefelsäure: λ max = 300 nm; α-Naphthol in konz. Schwefelsäure: λ max = 322 nm).

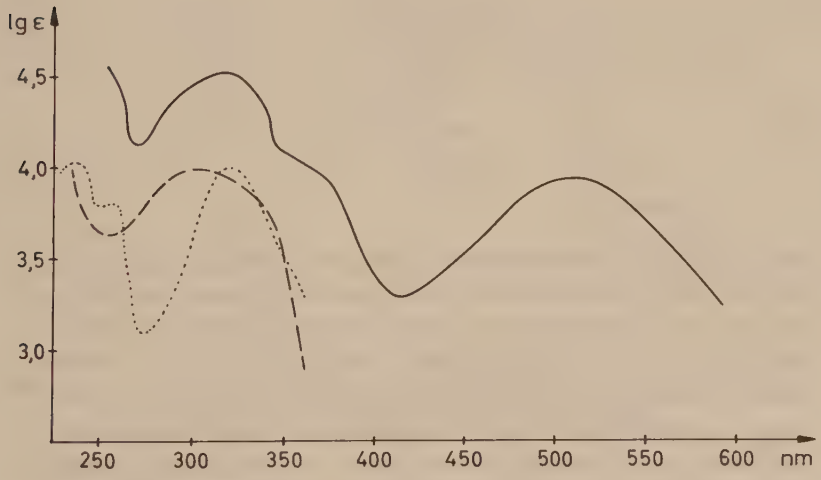


Abb. 33: Vergleichende elektronenspektroskopische Untersuchung

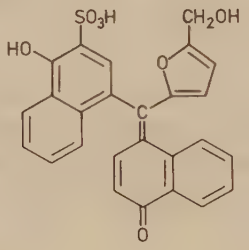
——— = Reaktionsansatz: Benzophenoncarbonsäurederivat und α-Naphthol in konz. Schwefelsäure

------ = Benzophenoncarbonsäurederivat, gemessen in konz. Schwefelsäure

····· = α-Naphthol, gemessen in konz. Schwefelsäure

b) Isolierung eines Produkts der Farbstofflösung

Die Reaktion einer Substanz mit einer Carbonylfunktion in konz. Schwefelsäure mit α-Naphthol erinnert an die Molisch-Reaktion, bei der das aus einer Pentose entstehende Furfurol in konz. Schwefelsäure mit α-Naphthol zu einem rotvioletten Farbstoff umgesetzt wird. BREDERECK [41] hat einen Farbstoff folgender Formel isoliert:



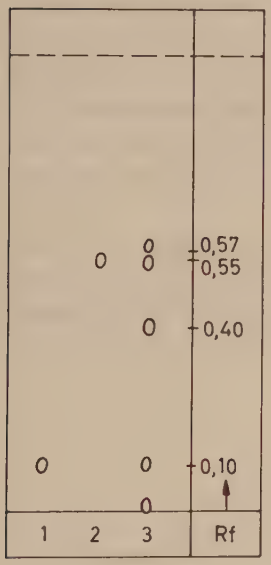
Analog zu der Versuchsbeschreibung von Bredereck setzten wir äquimolare Mengen des Benzophenonderivates von Chlortalidon mit α-Naphthol in konz. Schwefelsäure um. Die tief rotviolett gefärbte Lösung wurde 20 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Danach wurde die Lösung tropfenweise in eisgekühlten Ether eingerührt. Dabei entfärbte sich die Lösung und der Ether nahm eine gelbliche Färbung an. Am Boden des Gefäßes setzten sich gelbbraune Tropfen ab. Die etherische Lösung wurde abgegossen, mit Wasser und $NaHCO_3$-Lösung neutral gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und eingeengt.

Ein Dünnschichtchromatogramm des Rückstandes (Abb. 34) zeigt neben den Flecken bei Rf = 0,10 und 0,55, die vom Ausgangsprodukt bzw. von α-Naphthol stammen, zwei neue Flecke bei

---

41) H. Bredereck, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 65, 1110 (1932).

Rf = 0,40 und 0,57. Der leicht gelbliche Fleck bei Rf = 0,40 färbte sich beim Besprühen mit konz. Schwefelsäure tief violett an.



1 = Benzophenonderivat des Chlortalidon

2 = α-Naphthol

3 = Etherextrakt aus der Chlortalidon-Benzophenonderivat-α-Naphthol-konz. Schwefelsäure-Lösung

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Chloroform/Methanol (100 + 10)
Laufhöhe:	10 cm
Detektion:	1. UV-Licht 2. Besprühen mit konz. H_2SO_4: Fleck bei Rf = 0,40 färbt sich rotviolett

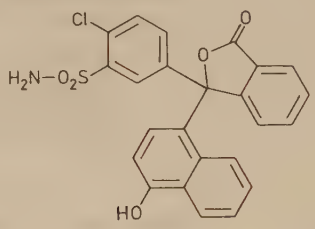
Abb. 34: Schematisches Dünnschichtchromatogramm des Etherextrakts der farbigen Reaktionslösung

Die Substanz mit dem Rf-Wert = 0,40 wurde durch präparative Schichtchromatographie isoliert. Es handelt sich um eine leicht gelbliche Substanz.

Der ölige, stark saure, gelbbraun gefärbte Rückstand am Boden des Reaktionsgefäßes färbte sich bei Zugabe von konz. Schwefelsäure rotviolett. Dieser Rückstand wurde nicht näher untersucht, da es sich um Sulfonierungsprodukte mit äußerst hydrophilen Eigenschaften handelt.

c) Spektroskopische Untersuchung des isolierten Produkts

Aufgrund von UV-, IR- und Massenspektrum handelt es sich bei dem aus der rotvioletten Lösung isolierten Produkt um eine Substanz mit folgender Struktur:



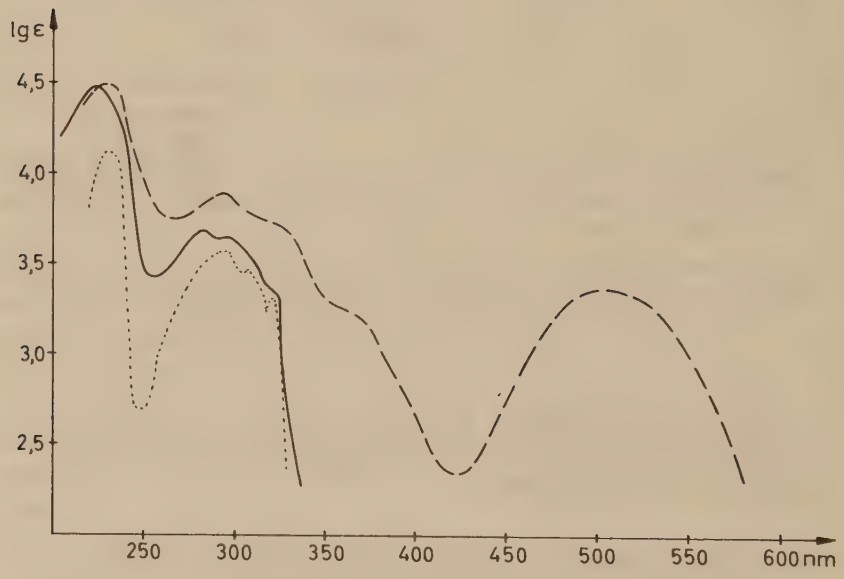
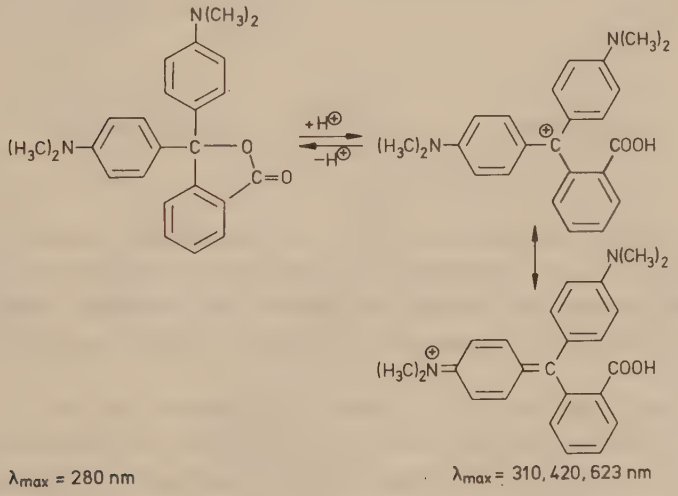


Abb. 35: Elektronenspektren der isolierten Substanz aus der Farblösung

——— = in Methanol/Chloroform (99+1) gemessen
– – – – = in konz. Schwefelsäure gemessen
····· = α-Naphthol, in Methanol gemessen

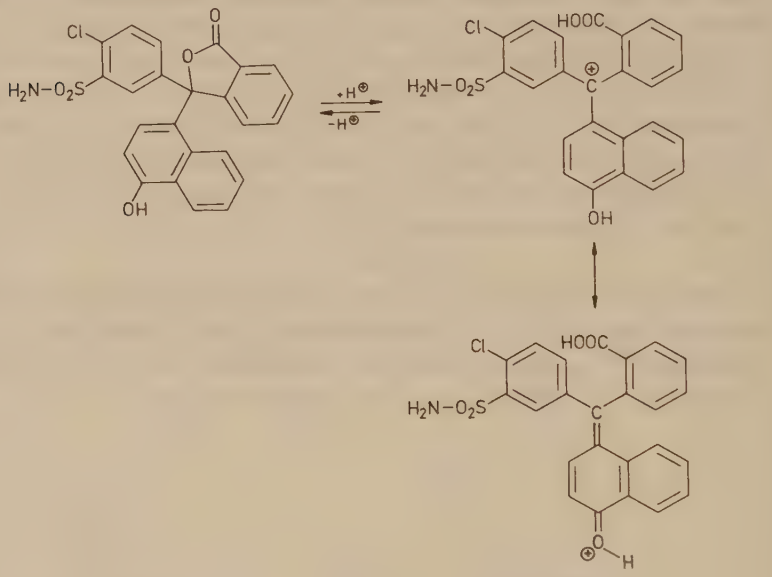
Das UV-Spektrum der Substanz (Abb. 35), gemessen in Methanol (= ———), zeigt Maxima bei 295, 285 und 225 nm. Auffallend ist, daß sich das Maximum bei 295 nm mit dem Hauptmaximum von α-Naphthol, ebenfalls in Methanol gemessen (= ·····), deckt. Dies spricht dafür, daß die Grundstruktur des α-Naphthol in der Substanz als Teil des Moleküls vertreten ist. Nimmt man das UV-Spektrum der Substanz in konz. Schwefelsäure (= -----) auf, so tritt im Vergleich zum im Methanol gemessenen Spektrum ein neues Maximum bei 510 nm auf, das Maximum bei 285 nm verschwindet und Schultern bei 330 und 370 nm werden sichtbar.

KORTÜM und VOGEL haben das elektronenspektroskopische Verhalten des Lactons der o-Carbonsäure des Malachitgrün untersucht [42] und berichten von folgendem reversiblen Mechanismus der Farbgebung in konz. Schwefelsäure:



42) G. Kortüm, J. Vogel, Chem. Ber. 93, 706 (1960).

In Analogie hierzu ist für die Farbigkeit des isolierten Produkts in konz. Schwefelsäure folgender Mechanismus zu postulieren:



λ_{max} = 285, 295 nm

λ_{max} = 295, 510 nm

Durch diesen Mechanismus wird die Beobachtung erklärt, daß die rotviolette Färbung unserer isolierten Substanz in konz. Schwefelsäure bei Zugabe von Wasser verschwindet, beim Ansäuern mit konz. Schwefelsäure jedoch wieder erscheint.

Daß die Substanz, die in Methanol UV-Maxima bei 285 nm und 295 nm zeigt, in Lactonform vorliegt, ist im IR-Spektrum (Abb. 36) zu erkennen. Während die aromatische COOH-Gruppe des Chlortalidonbenzophenonderivats bei 1.720 cm^{-1} absorbiert (Abb. 27), ist die Carbonyl-Absorption im IR-Spektrum der aus dem Etherextrakt der Farbstofflösung isolierten Substanz nach 1.755 cm^{-1} verschoben, was für die Lactonstruktur spricht. Die für die Ketogruppe von Benzophenonen typische Bande bei 1.650 cm^{-1} ist verschwunden. Die Aminschwin-

gungen der SO_2-NH_2-Gruppe bei 3.400 und 3.290 cm^{-1} sind überlagert von der phenolischen O-H-Valenzschwingung bei 3.300 cm^{-1}.

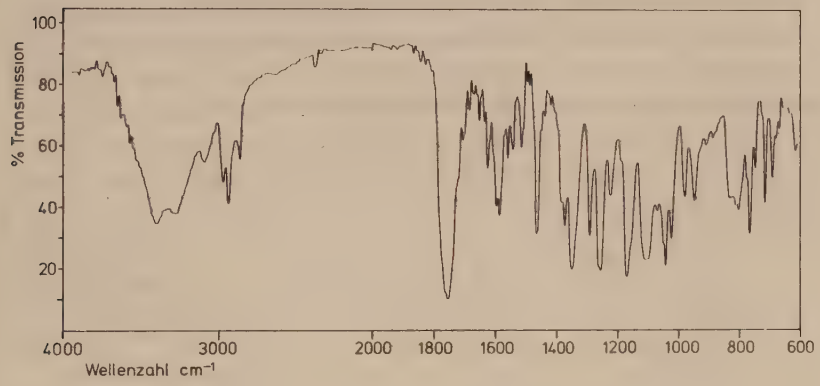


Abb. 36: IR-Spektrum der aus der Farbstofflösung isolierten Substanz

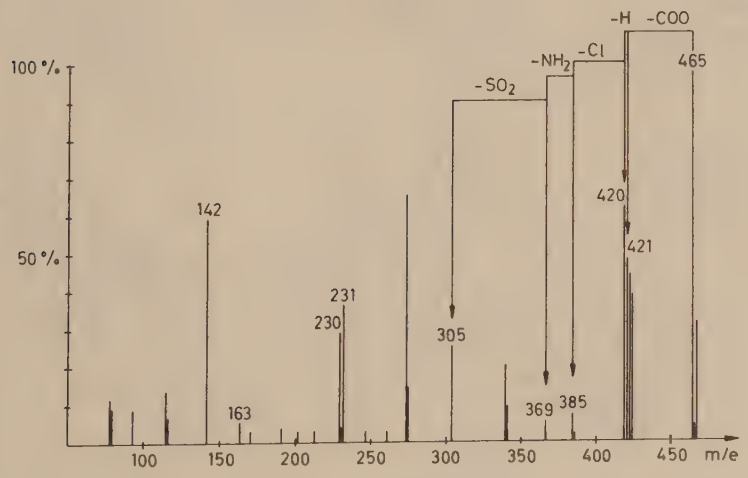
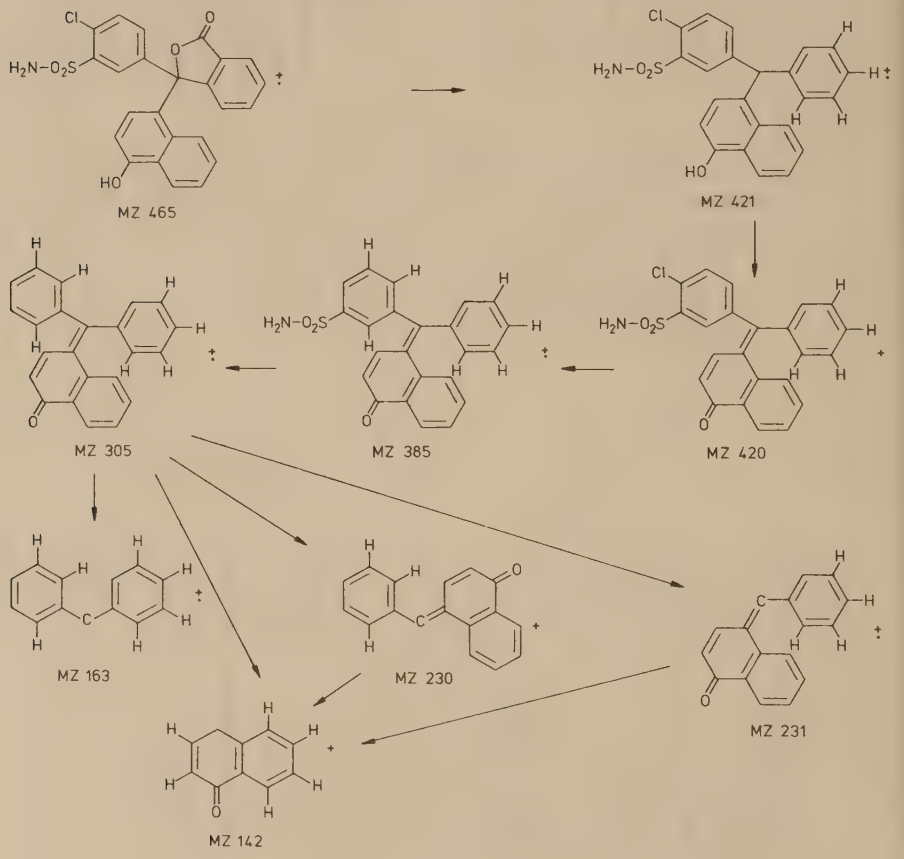


Abb. 37: Massenspektrum der aus der Farbstofflösung isolierten Substanz (Probentemperatur: 235 °C)

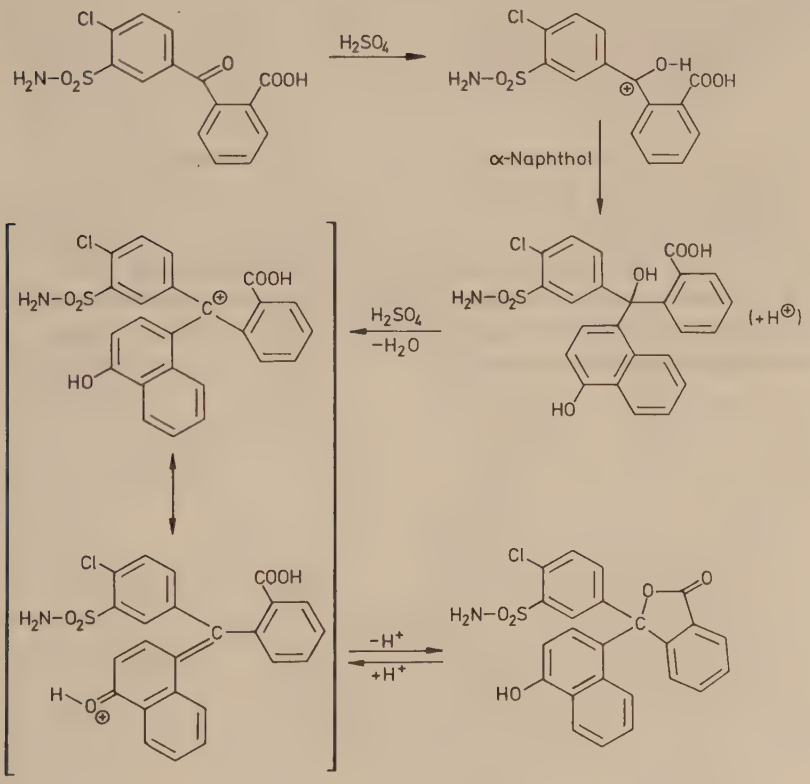
Das Massenspektrum der aus dem Etherextrakt der Farbstofflösung isolierten Substanz (Abb. 37) zeigt Peaks bei m/e 465, 466 und 467, die in ihrer Intensität der Isotopenverteilung chlor- und schwefelhaltiger Verbindungen entsprechen, was für eine Molekülmasse von 465 spricht.

Folgenden Fragmenten lassen sich Peaks zuordnen:



d) Zum Reaktionsmechanismus und zur Spezifität der Reaktion

Da beispielsweise Benzophenon in konz. Schwefelsäure mit α-Naphthol lediglich gelb gefärbt ist, jedoch keine Reaktion zu einem violett gefärbten Produkt eingeht, sind die elektronenanziehenden Substituenten des Chlortalidon-Benzophenonderivats für diese Farbreaktion erforderlich. Für die elektrophile Substitution von α-Naphthol in konz. Schwefelsäure ist folgender Reaktionsmechanismus wahrscheinlich:



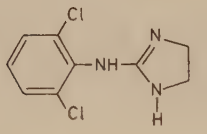
Da aus Chlortalidon beim Erhitzen in konz. Schwefelsäure das Benzophenoncarbonsäurederivat entsteht und dieses recht spezifisch durch die eben beschriebene Reaktion mit α-Naphthol zu einem in konz. Schwefelsäure rotviolett gefärbten Produkt umgesetzt werden kann, steht hiermit neben der in Brit. 73 beschriebenen Gelbfärbung in konz. Schwefelsäure eine weitere, die Gelbfärbung in konz. Schwefelsäure ergänzende Farbreaktion für Chlortalidon zur Verfügung. Vorteilhaft ist folgendes Vorgehen: Etwa 20 mg Chlortalidon werden mit 1 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die intensiv gelbe Lösung wird kurz erhitzt, bis erste Nebeldämpfe entstehen. Gibt man in die abgekühlte Reaktionslösung etwa 5 mg α-Naphthol, so tritt sofort eine tiefe Rotviolett-Färbung auf.

Tabelle 10 zeigt, daß die so ausgeführte Reaktion für Chlortalidon im Vergleich zu den anderen untersuchten antihypertensiven Substanzen charakteristisch ist. Zwar geben auch Triamteren, Spironolacton, Polythiazid und Quinethazon in konz. Schwefelsäure eine Gelbfärbung, keine dieser Substanzen zeigt jedoch nach Erhitzen in konz. Schwefelsäure und Zugabe von α-Naphthol eine Rotviolett-Färbung.

Tab. 10: Färbungen der Substanzen nach Zugabe von konz. Schwefelsäure, nach Erhitzen und nach Zugabe von α-Naphthol in die abgekühlte Reaktionslösung

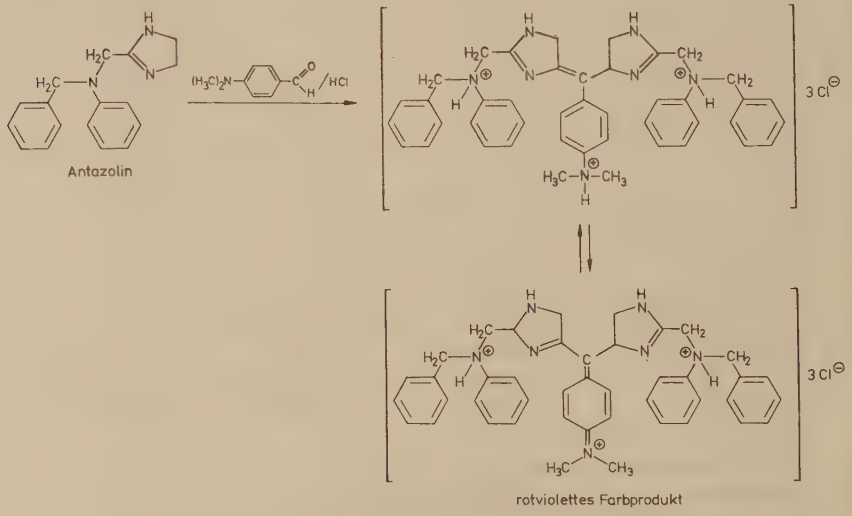
Substanz	Färbung nach Zugabe von konz. H_2SO_4	Färbung nach Erhitzen in konz. H_2SO_4	Färbung nach Zugabe von α-Naphthol in die nach Erhitzen abgekühlte Reaktionslösung
Chlortalidon	intensiv gelb	intensiv gelb	tief rotviolett
Reserpin	gelbgrün	braun	braun
Guanethidin-sulfat	---	---	---
Clonidin-hydrochlorid	---	---	---
Tolazolin-hydrochlorid	---	---	---
Dihydralazin-sulfat	---	---	---
Triamteren	gelb	gelb	gelb
Spironolacton	intensiv gelb	rot	rot
Methyldopa	---	rot	rot
Chlorothiazid	---	---	---
Hydrochlorothiazid	---	grün	gelb
Trichlormethiazid	---	gelb	rot
Buthiazid	---	gelb	gelb
Cyclopenthiazid	---	rot	rot
Polythiazid	gelb	rot	rot
Bendroflumethiazid	blau	schwarz	schwarz
Furosemid	rotbraun	schwarz	schwarz
Clopamid	---	gelbbraun	gelbbraun
Xipamid	---	gelb	gelb
Quinethazon	gelb	gelb	gelb
Mefrusid	---	braun	braun

VIII. Zur Analytik von Clonidin



Clonidin fiel unter den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen analytisch dadurch auf, daß es außer mit den relativ unspezifischen Reagenzien wie die nach Mayer, Dragendorff und Zwikker mit anderen gängigen Reagenzien keine Reaktion einging (vgl. Tab. 5 - 7).

Versuche, den Imidazolin-Ring mit Dimethylaminobenzaldehyd unter verschiedenen Bedingungen zur Reaktion zu bringen, schlugen fehl. Antazolin, ebenfalls ein Imidazolinderivat,



rotviolettes Farbprodukt

reagiert beispielsweise beim Erhitzen mit Ehrlich-Reagens zu einem blauvioletten Farbprodukt [43]. Daß diese für einen Imidazolinring charakteristisch angesehene Reaktion nicht gelingt, könnte den Grund darin haben, daß der Imidazolinring am C-2 nicht durch eine Methylengruppe substituiert ist, sondern durch ein sekundäres Amin, auf das wiederum ein durch zwei Chlorsubstituenten relativ elektronenarmer Aromat seinen Einfluß ausübt.

Versuche, den Imidazolinring mit Schwefel zu dehydrieren und den dabei entstehenden Imidazolring mit diazotierter Sulfanilsäure zu kuppeln, schlugen ebenfalls fehl.

Energisches Erhitzen mit konz. Schwefelsäure und HNO_3 führte nicht zu irgendwelchen brauchbaren Färbungen.

1. Erhitzen mit konz. NaOH-Lösung bis zur Blaufärbung

Erhitzte man jedoch Clonidin in konz. NaOH-Lösung, bis das gesamte Wasser verdampft war, und ließ dann die Schmelze sofort erkalten, so trat hierbei eine auffällige Blaufärbung auf. Diese blaue Farbe ging bei der Extraktion in Ether über. Das UV-Spektrum (Abb. 38) zeigt Maxima bei 525 nm und 560 nm.

Die dünnschichtchromatographische Untersuchung des Etherextrakts (Abb. 39) ließ erkennen, daß die lachsfarbene Substanz mit Rf = 0,60, die beim Besprühen mit NaOH-Lösung in Blau überging, im Vergleich zum Ausgangsprodukt Clonidin nur in sehr geringer Menge entstanden war. Der Anteil der lachsfarbenen bzw. blauen Substanz ließ sich jedoch durch längeres Erhitzen nicht erhöhen, da die Blaufärbung der NaOH-Schmelze dann sehr rasch in ein Rotbraun überging.

---

43) W. Liesenklas, H. Auterhoff, Dtsch. Apoth. Ztg. 105, 1243 (1965).

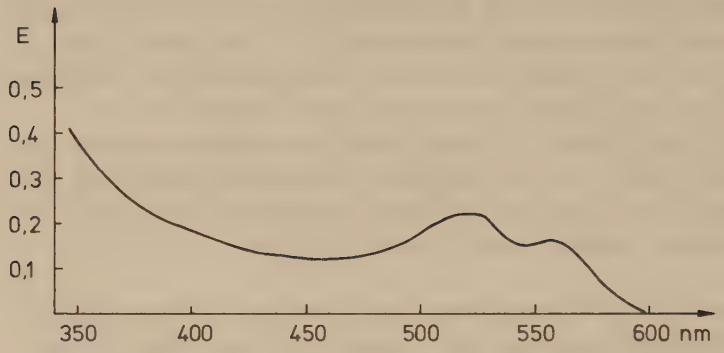
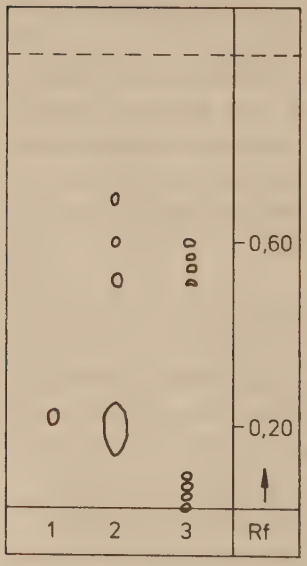


Abb. 38: UV-Spektrum des Ether-Extrakts aus der erstarrten Clonidin-NaOH-Lösung



1 = Clonidin

2 = Etherextrakt aus erstarrter Clonidin-NaOH-Lösung

3 = Substanz Rf = 0,60, durch präparative Schichtchromatographie gereinigt

Adsorbens:	Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel:	Chloroform/Methanol (135 + 20)
Laufhöhe:	10 cm
Detektion:	1. UV-Licht 2. Besprühen mit 10 proz. NaOH: Lachsfarbener Fleck bei Rf = 0,60 färbt sich blau

Abb. 39: Schematisches Dünnschichtchromatogramm des Etherextrakts aus der blauen erstarrten Clonidin-NaOH-Lösung

Dennoch isolierten wir durch präparative Schichtchromatographie die lachsfarbene Substanz, die jedoch äußerst instabil war, wie die DC-Untersuchung (Abb. 39) zeigte. Eine spektroskopische Untersuchung und damit Charakterisierung der Substanz war deshalb nicht möglich. Durch ESR-spektroskopische Untersuchung des Etherextrakts konnte lediglich ausgeschlossen werden, daß die Blaufärbung auf Radikalbildung beruht.

2. NaOH-Schmelze und Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure

Die Blaufärbung, die nach Erhitzen von Clonidin in konz. NaOH-Lösung bis zum vollständigen Verdampfen des Wassers beim Erkalten der Schmelze entstand, ging bei weiterem Erhitzen der Schmelze sehr rasch in ein tiefes Rotbraun über. Der wässrige Extrakt der Schmelze ließ sich mit diazotierter Sulfanilsäure zu einer tiefrot gefärbten Lösung kuppeln. Wie eine dünnschichtchromatographische Untersuchung eines Chloroformextrakts aus dem auf pH 8 - 9 eingestellten wässrigen NaOH-Schmelze-Extrakt zeigte, waren mehr als zehn Produkte in etwa gleicher Menge bei diesem energischen Schmelzvorgang entstanden. So schien es wenig erfolgversprechend, die mit diazotierter Sulfanilsäure eventuell reagierenden Substanzen zu isolieren und zu charakterisieren. Zu vermuten ist, daß Phenole die Kupplungspartner sind.

Zum Nachweis von Clonidin kann folgendermaßen vorgegangen werden: Man erhitzt etwa 20 mg Clonidinhydrochlorid mit etwa 1 ml konz. NaOH-Lösung im Reagenzglas, bis kein Wasserdampf mehr entweicht. Läßt man nun erkalten, so färbt sich die Oberfläche der erstarrenden Schmelze blau. Erhitzt man auf der offenen Flamme weiter, so geht das Blau über Rotviolett in ein tiefes Rotbraun über, wobei nach Aminen riechende, dunkle Dämpfe entweichen. Nun läßt man erkalten und eluiert mit etwa 2 ml Wasser. Versetzt man dieses Eluat mit 1 ml einer frisch bereiteten Mischung aus gleichen Teilen Sulfanilsäure-Lösung und 10 proz. $NaNO_2$-Lösung, so entsteht eine tiefrote Färbung.

IX. Zusammenfassung

Die untersuchten 21 als Antihypertonika eingesetzten Substanzen konnten aus Fertigarzneimitteln gemäß ihrer chemischen Verschiedenheit nur durch verschiedenartiges Vorgehen isoliert werden. Bei den basisch reagierenden Substanzen Guanethidin, Clonidin, Tolazolin und Dihydralazin extrahiert man mit Ether aus natronalkalischem Milieu, bei Reserpin schüttelt man aus einer wässrigen Aufschlämmung der Zubereitungsform mit Chloroform, bei Triamteren mit n-Butanol aus. Spironolacton wird direkt aus der zerkleinerten Tablettenzubereitung mit Chloroform extrahiert. Methyldopa kann man aus einem wässrigen Extrakt durch Einstellen der Lösung auf pH 4 - 5 ausfällen. Die Isolierung der Diuretika (Thiadiazin-, Dihydrothiadiazin- und Chlorbenzolsulfonamidderivate) erfolgt durch Extrahieren mit Aceton.

Eine Trennung der häufig in Kombinationspräparaten vorliegenden Substanzen ist mit Hilfe des Stas-Otto-Gangs möglich. Außer Quinethazon fallen alle Sulfonamid-Diuretika in Fraktion I A (etherlösliche Säuren) an, teilweise allerdings zu einem geringen Prozentsatz. In Fraktion III (etherlösliche Basen) sind alle basisch reagierenden Substanzen mit Ausnahme von Reserpin vertreten. So ergibt bereits der Stas-Otto-Gang einen ersten Hinweis auf die vorliegenden Substanzen.

Für die Dünnschichtchromatographie an Kieselgelplatten eignet sich ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Ammoniak (80 + 14 + 1). Vorteilhaft ist ein zweites Entwickeln der Platte in wassergesättigtem Essigsäureethylester. Eine Färbung nach dem Entwickeln weisen Dihydralazin (rot), Methyldopa (rotbraun) und Triamteren (gelb) auf. Im UV-Licht können die anderen Substanzen mit Ausnahme von Guanethidin detektiert werden. Zur weiteren Identifizie-

rung dient das Besprühen mit Dragendorff-Reagens (nach Besprühen mit verd. Schwefelsäure und Erhitzen geben die basisch reagierenden Substanzen, Spironolacton und Furosemid Färbungen) oder mit Ehrlich-Reagens, mit dem auch die meisten Diuretika nach dem Erhitzen eine Färbung geben. Die entstehenden weniger spezifischen Färbungen mit Vanillin/H_2SO_4, mit Erdmann-, Mandelin- und Marquis-Reagens können des weiteren zusammen mit dem Rf-Wert die Identität einer Substanz sichern.

In Lösung ergeben einige Substanzen brauchbare Färbungen mit Alkaloid-Farbreagenzien. Neben den Färbungen von Reserpin sind besonders bemerkenswert das Rot bei Cyclopenthiazid durch Vanillin/H_2SO_4 und Froehde-Reagens, das Violett bei Bendroflumethiazid durch Froehde- und Mandelin-Reagens, das Weinrot bei Furosemid durch Methanol/H_2SO_4 und das Olivgrün durch Erdmann-Reagens. Die Fällungsreaktion mit Mayer-Reagens ist bei allen basisch reagierenden Substanzen positiv. Bei den Diuretika Hydrochlorothiazid, Trichlormethiazid, Buthiazid, Cyclopenthiazid, Polythiazid, Bendroflumethiazid, Furosemid und Quinethazon fällt die Diazo-Reaktion nach salzsaurer Hydrolyse positiv aus. Hydrochlorothiazid, Trichlormethiazid und Bendroflumethiazid ergeben eine positive Chromotropsäure-Reaktion. Mit Ausnahme von Reserpin, Guanethidin, Dihydralazin, Triamteren, Spironolacton und Methyldopa stellen sich bei der Zwikker-Reaktion Blau- oder Violett-Färbungen ein.

Die UV-Spektroskopie kann für die Stoffklasse der Antihypertonika nur begrenzt eingesetzt werden. Sechs Dihydrothiadiazinderivate, Clopamid und Mefrusid können nicht eindeutig, Guanethidin wegen fehlender Absorption überhaupt nicht identifiziert werden.

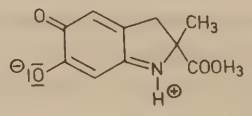
Charakteristische Einzelreaktionen sind durchführbar bei Reserpin (Blaufärbung durch $H_2SO_4/FeCl_3$), Dihydralazin (Rotviolettfärbung durch $FeCl_3$, gelb-grüne Fluoreszenz in

NH_3 nach Erhitzen mit H_2SO_4/H_2O_2 und Versetzen mit Resorcin), Guanethidin (Sakaguchi-Reaktion, nach Ammoniak riechende Dämpfe beim Schmelzen), Spironolacton (gelbgrüne Fluoreszenz in H_2SO_4, die in eine rote Färbung übergeht; bei Zugabe von Wasser Farbwechsel nach Gelb), Polythiazid (beim Erhitzen in 10 proz. NaOH-Lösung intensiver Geruch nach H_2S), Trichlormethiazid (nach alkalischer Hydrolyse Chlorid-Nachweis) und Bendroflumethiazid (Geruch nach Benzaldehyd beim Erhitzen mit $KMnO_4$-Lösung und verd. H_2SO_4).

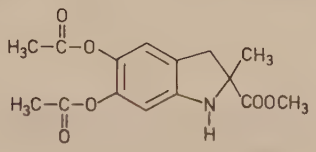
Näher untersucht wurden folgende Farbreaktionen:

- die Rotfärbung von Methyldopa nach Oxidation im alkalischen Milieu, die Rotfärbung nach Zugabe von $NaNO_2/HCl$ im natronalkalischen Milieu und die Gelbbraun-Färbung nach Erhitzen mit Nitrobenzoylchlorid und Zugabe von Na_2CO_3-Lösung
- die Gelbfärbung von Chlortalidon in konz. H_2SO_4 und die Violettfärbung nach Zugabe von α-Naphthol zu der zuvor in konz. H_2SO_4 erhitzten Lösung
- die Blaufärbung von Clonidin beim Erhitzen in konz. NaOH-Lösung.

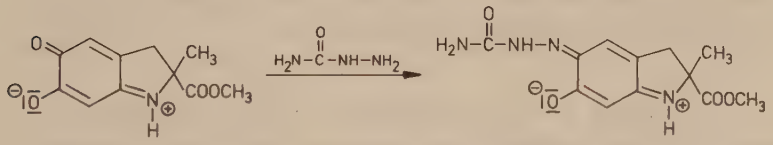
Methyldopa ergibt in einer Pufferlösung pH 8 nach Zugabe von $K_3[Fe(CN)_6]$-Lösung augenblicklich eine tiefe Rotfärbung. Um eine Extraktion des roten Farbstoffs aus dem wässrigen Milieu zu ermöglichen, wurde in allen Versuchen mit dem Methyldopa-methylester gearbeitet. Bereits der elektronenspektroskopische Vergleich eines Butanol-Auszugs aus der Oxidationslösung mit Adrenochrom gab einen ersten Hinweis, daß es sich um einen dem Adrenochrom ähnlichen Farbstoff handelt.



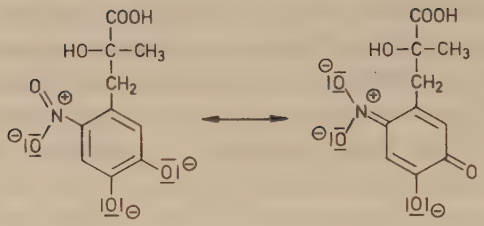
Da sich der Farbstoff wegen leichter Zersetzlichkeit nicht isolieren ließ, wurde das Produkt reduziert und durch Acetylieren stabilisiert. Nach Isolierung des reduzierten und acetylierten Produkts konnte UV-, IR-, NMR- und MS-spektroskopisch folgende Dihydroindol-Struktur gesichert werden:



Die bevorzugt zwitterionische Struktur von Methyldopachrom konnte durch Umsetzung mit Semicarbazid zu einem Monosemicarbazon gesichert werden.



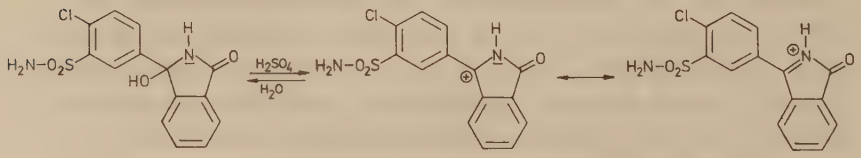
Die Rotfärbung von Methyldopa nach Zugabe von $NaNO_2$/HCl in natronalkalischem Milieu hat ihre Ursache nicht in der Entstehung von Methyldopachrom. Ein Ringschluß zu einem Dihydroindolderivat ist nicht möglich, da primäre aliphatische Amine bei der Einwirkung von salpetriger Säure in die entsprechenden Alkohole übergehen. Die Färbung im alkalischen Milieu ist auf die Mesomerie des in 6-Stellung nitrierten Brenzkatechinsystems zurückzuführen.



Die Entstehung der alkoholischen OH-Gruppe und die Nitrierung des Aromaten konnte aufgrund einer nach Acetylieren isolierten Substanz wahrscheinlich gemacht werden.

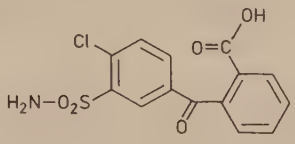
Die Gelbbraun-Färbung von Methyldopa nach Erhitzen mit Nitrobenzoylchlorid in Wasser/Pyridin und nach Zugabe von Na_2CO_3-Lösung läßt sich auf die Oxidation des Brenzkatechinsystems zurückführen. Ein Ringschluß zu Methyldopachrom ist aufgrund der Blockierung der NH_2-Gruppe durch die Nitrobenzamidbildung verhindert.

Die Gelbfärbung von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure beruht auf der Bildung von Carbeniumionen. Der UV-spektroskopische Vergleich mit analogen Verbindungen zeigte, daß einmal die Mesomerie mit Imoniumionen, zum anderen die Protonierung der Ketogruppe die Färbung beeinflußt.

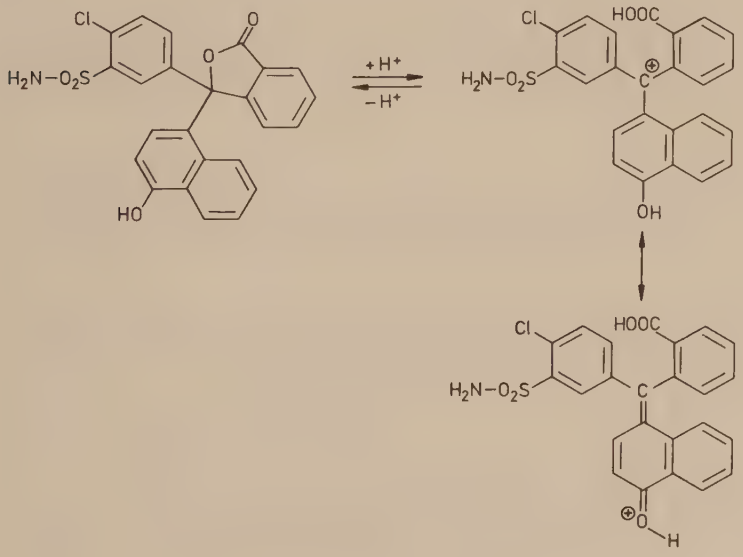


Bei längerem Stehen oder Erhitzen einer Chlortalidon-Schwefelsäure-Lösung entsteht ein Produkt, das UV-, IR-, NMR- und MS-spektroskopisch als 3'-Sulfamyl-4'-chlor-

benzophenon-2-carbonsäure identifiziert wurde.



Versetzt man die Benzophenoncarbonsäure in konz. H_2SO_4 mit α-Naphthol, so tritt eine tiefe Violettfärbung auf. Aus dem Etherextrakt konnte eine leicht gelbliche Substanz isoliert und als Lacton identifiziert werden. Aufgrund spektroskopischer Befunde ist folgender reversibler Mechanismus der Farbgebung wahrscheinlich:



Diese Violettfärbung, die nach Erhitzen von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure und Zugabe von α-Naphthol in die erkaltete Lösung entsteht, ergibt kein anderes hier untersuchtes Antihypertonikum.

Erhitzt man Clonidin in konz. NaOH-Lösung, so entsteht beim Erkalten der NaOH-Schmelze eine Blaufärbung. Durch ESR-spektroskopische Untersuchung konnte ausgeschlossen werden, daß die Farbe durch Radikale bedingt ist. Das isolierte Farbprodukt ließ sich wegen Instabilität nicht identifizieren. Erhitzt man die Clonidin-NaOH-Schmelze bis zur Rotbraun-Färbung, so gibt ein wässriger Extrakt mit diazotierter Sulfanilsäure eine Rotfärbung.

X. Beschreibung der Versuche

Schmelzpunkte

Die Schmelzpunkte wurden mit der Schmelzpunktapparatur nach Linström ermittelt und sind unkorrigiert angegeben.

Elektronenspektren

Die Messungen wurden mit dem Beckman-Spektralphotometer DB-GT in Quarzküvetten (Schichtdicke 1 cm) durchgeführt. Die Lösungsmittel sind bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

Infrarotspektren

Die Aufnahmen erfolgten mit den Beckman-IR-Spektrometern AccuLab T.M.2 und IR 20, A-X mit Hilfe von KBr-Preßlingen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden mit einem Varian-Gerät Typ CH-7 aufgenommen.

NMR-Spektren

Die Aufnahme der Kernresonanzspektren erfolgte mit einem Bruker WP-80-Gerät. Als Referenzsignal diente TMS.

ESR-Spektren

Die Messung erfolgte mit einem Varian E 12-Gerät. Lösungsmittel: Ether. Magnetfeldmodulation: 100 kHz.

Dünnschichtchromatographie

Die DC-Analysen wurden mit DC-Fertigplatten der Firma Merck, Darmstadt, ausgeführt. Plattenbeschichtung, Fließmittel und Detektion sind bei der jeweiligen schematischen Abbildung des Dünnschichtchromatogramms angegeben.

Elementaranalysen

Die Elementaranalysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium Ilse Beetz, Kronach/Ofr. durchgeführt.

II. Isolierung der Substanzen aus Fertigarzneimitteln

Die Tabletten wurden jeweils zu einem feinen Pulver zerrieben und dem angegebenen Extraktionsverfahren unterworfen.

Sedaraupin^R (10 Tabletten à 0,2 mg Reserpin)
Serpasil^R (8 Tabletten à 0,25 mg Reserpin)
Das Pulver wird in 10 ml Wasser suspendiert, die Chloroformextrakte (3 x 15 ml) über Na_2SO_4 getrocknet und im Rotationsverdampfer eingeengt auf etwa 2 ml. Diese eingeengte Lösung wird zur Dünnschichtchromatographie verwendet. Das DC nach den bei Abbildung 2 angegebenen Bedingungen zeigt einen Fleck bei Rf = 0,78.

Ismelin^R (10 Tabletten à 10 mg Guanethidinsulfat)
Die Suspension des Pulvers in 10 ml Wasser wird mit 3 N-Natronlauge auf pH > 10 gebracht. Danach wird dreimal mit 15 ml Ether ausgeschüttelt. Die Etherextrakte werden über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wird im Exsikkator getrocknet und gewogen.
Isolierte Menge an Guanethidin-Base: 34 %.

Catapresan^R (10 Tabletten à 0,3 mg Clonidinhydrochlorid)
Die Suspension des Pulvers in 10 ml Wasser wird mit 3 N-Natronlauge auf pH > 10 gebracht. Mit 15 ml Ether wird dreimal ausgeschüttelt. Die auf 2 ml eingeengten Etherfraktionen werden dünnschichtchromatographiert. Als Fließmittel wird Chloroform/Methanol/NH_3 (80+14+1) verwendet. Das DC zeigt neben dem Fleck des Clonidin (Rf = 0,65) einen zweiten mit Rf = 0,78.

Priscol^R (4 Tabletten à 25 mg Tolazolinhydrochlorid)
Die Isolierung der Tolazolin-Base geschieht auf dieselbe Weise, wie unter Ismelin^R beschrieben.
Isolierte Menge an Tolazolin-Base: 96 %.

Nepresol^{R} (4 Tabletten à 25 mg Dihydralazinsulfat)
Das gelbliche Pulver wird in 10 ml Wasser suspendiert. Nach Alkalisieren mit 3 N-Natronlauge auf pH $\geq$10 wird dreimal mit 15 ml Chloroform/Isopropylalkohol (3+1) ausgeschüttelt. Der gelbe Farbstoff der Tablettengrundmasse bleibt dabei in der wässrigen Phase. Die vereinigten und über Na_2SO_4 getrockneten Auszüge werden zur Trockne eingeengt.
Isolierte Menge an Dihydralazin-Base: 43 %.

Jatropur^{R} (2 Tabletten à 50 mg Triamteren)
Die alkalisierte Suspension des Pulvers in 10 ml Wasser wird dreimal mit 15 ml n-Butanol ausgeschüttelt. Nach Verdampfen des Butanols wird der Rückstand zur Wägung gebracht.
Isolierte Menge an Triamteren: 25 %.

Aldactone^{R} (2 Dragees à 50 mg Spironolacton)
Die Suspension des Pulvers in 10 ml Wasser wird dreimal mit 15 ml Chloroform extrahiert. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und Trocknen im Exsikkator wird gewogen.
Isolierte Menge an Spironolacton: 96 %.

Presinol^{R} (2 Lacktabletten à 250 mg Methyldopa)
Das Pulver wird dreimal mit 15 ml Wasser extrahiert. Es ist nicht möglich, den gelben, wasserlöslichen Farbstoff der Tablettengrundmasse mit einem organischen Lösungsmittel auszuschütteln. Durch Zugabe von $NaHCO_3$-Lösung zur wässrigen Lösung läßt sich Methyldopa beim isoelektrischen Punkt (pH 4,9) ausfällen.
Isolierte Menge an Methyldopa: 95 %.

Diuretika-Fertigarzneimittel
Die Isolierung der Thiazide bzw. Chlorbenzolsulfonamide aus den Spezialitäten ist durch Extraktion mit Aceton möglich.

III. Die Physikalischen Konstanten der Antihypertonika

Löslichkeitsverhalten

Etwa 50 mg Substanz, genau gewogen, werden im Weithalserlenmeyerkolben in Lösung gebracht, indem aus einer Bürette das jeweilige Lösungsmittel zugetropft wird. Die Bestimmung wird bei Raumtemperatur unter kräftigem Schütteln ausgeführt.

IV.1. Dünnschichtchromatographie der Antihypertonika

Die Substanzen werden in geeigneten Lösungsmitteln (siehe Tab. 4) gelöst und auf die Platte aufgetragen. Die Bedingungen, unter denen die Dünnschichtchromatogramme entwickelt werden, sind bei den schematischen Dünnschichtchromatogrammen (Abb. 1 und 2) angegeben.

Rf-Werte der Antihypertonika

Abbildung 1

1	Reserpin	Rf = 0,78	
2	Dihydralazin	Rf = 0,70	
3	Clonidin	Rf = 0,65	
4	Triamteren	Rf = 0,27	(Schwanzbildung)
5	Tolazolin	Rf = 0,25	
6	Guanethidin	Rf = 0,00	

Abbildung 2		Nach Entwickeln in Fließmittel Nr. 1	Nach Entwickeln in Fließmittel Nr. 1 und Nr. 2
1	Methyldopa	Rf = 0,00	Rf = 0,00
2	Chlorothiazid	Rf = 0,02	Rf = 0,22
3	Furosemid	Rf = 0,02	Rf = 0,06
4	Xipamid	Rf = 0,04	Rf = 0,52
5	Trichlormethiazid	Rf = 0,08	Rf = 0,60
6	Hydrochlorothiazid	Rf = 0,10	Rf = 0,43
7	Quinethazon	Rf = 0,17	Rf = 0,36

		Nach Entwickeln in Fließmittel Nr. 1	Nach Entwickeln in Fließmittel Nr. 1 und Nr. 2
8	Chlortalidon	Rf = 0,21	Rf = 0,50
9	Cyclopenthiazid	Rf = 0,23	Rf = 0,66
10	Buthiazid	Rf = 0,24	Rf = 0,65
11	Bendroflumethiazid	Rf = 0,27	Rf = 0,72
12	Polythiazid	Rf = 0,29	Rf = 0,70
13	Clopamid	Rf = 0,43	Rf = 0,61
14	Mefrusid	Rf = 0,55	Rf = 0,76
15	Spironolacton	Rf = 0,77	Rf = 0,86

Detektionsmittel

1) UV-Licht (außer Guanethidin sind damit alle Substanzen zu detektieren).

2) Dragendorff-Reagens nach Munier und Macheboef:
Lösung a: 0,85 g basisches Bismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.
Lösung b: 8 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst.
Sprühreagens: 5 ml Lösung a werden mit 5 ml Lösung b gemischt, 20 ml Eisessig zugefügt und mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

3) Ehrlich-Reagens
1,0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird in einem Gemisch aus 25 ml 35 bis 38 proz. Salzsäure und 75 ml Methanol gelöst.

4) Methanol/Schwefelsäure
Gleiche Volumenteile konz. Schwefelsäure und Methanol werden vorsichtig unter Kühlung gemischt.

5) Vanillin/H_2SO_4
1,0 g Vanillin werden in 100 ml konz. Schwefelsäure gelöst.

6) Froehde-Reagens
1,0 g Ammoniummolybdat werden in 100 ml konz. Schwefel-

säure gelöst.

7) Mandelin-Reagens
0,5 g Ammoniumvanadat werden in 100 ml konz. Schwefelsäure gelöst.

8) Marquis-Reagens
3 ml konz. Schwefelsäure werden mit 2 bis 3 Tropfen 35 proz. Formaldehydlösung frisch gemischt.

9) Erdmann-Reagens
20 ml konz. Schwefelsäure werden mit 0,5 ml 0,15 proz. Salpetersäure gemischt.

IV.2.b) Reaktionen der Antihypertonika in Lösung

Mayer-Reagens
1,35 g $HgCl_2$ werden in 100 ml 5 proz. Kaliumjodid-Lösung gelöst. Zu einer schwach schwefelsauren Lösung der Substanz werden einige Tropfen des Reagens gegeben. Bei positiver Reaktion entsteht eine gelblich-weiße Fällung.

Diazo-Reagenzien
Reagens I: 10 g $NaNO_2$ werden in 100 ml Wasser gelöst.
Reagens II: 0,25 g 2-Naphthol werden in 100 ml 3 N-Natronlauge gelöst.
Eine Lösung von etwa 50 mg Substanz in 1 ml 3 N-Salzsäure wird mit 2 Tropfen Diazo-Reagens I versetzt. Diese Lösung wird in 2 ml Diazo-Reagens II gegossen. Bei positiver Reaktion tritt eine orangerote Färbung oder Fällung auf.

Chromotropsäure-Reaktion
10 mg Substanz werden in 2 ml konz. Schwefelsäure, die 5 mg Natriumchromotropat enthalten, vorsichtig erhitzt.

Zwikker-Reaktion

Nach DAB 7:
Zwikker-Reagens I: 1 % Cobalt(II)-nitrat in Methanol

Zwikker-Reagens II: 10 % Piperidin in Methanol
Die Reaktion wird in der Modifikation nach AUTERHOFF/KOVAR [44] durchgeführt. Auf einer Tüpfelplatte werden 10 mg Substanz mit 10 Tropfen Zwikker-Reagens I versetzt. Danach werden 2 Tropfen Zwikker-Reagens II zugegeben.

Nach Ph. Eur.: [45]
30 bis 50 mg Substanz werden in 2 ml einer 0,2 proz. methanolischen Lösung von Cobalt(II)-acetat gelöst. Die erwärmte Lösung wird mit 30 bis 50 mg Natriumtetraborat versetzt und die Mischung zum Sieden erhitzt.

IV.2.c) Spezielle Nachweisreaktionen für einzelne Substanzen

Reserpin

Farbreaktion mit $FeCl_3/H_2SO_4$: [46] 1,0 mg Substanz wird mit 2 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Es entsteht eine gelbgrüne Lösung. Auf Zusatz von 0,25 ml 3 proz. Eisen(III)-chlorid-Lösung entsteht eine Blaufärbung, die auf Zugabe von 0,1 ml 3 N-Salpetersäure nach Gelbbraun umschlägt.

Dihydralazin

Farbreaktion mit $FeCl_3$ (2 AB DDR): 20 mg Substanz werden in 5 ml Wasser gelöst. Mit Weinsäure wird die Lösung auf pH 3 - 4 gebracht. Nach Zusatz von 2 Tropfen 0,5 proz. Eisen(III)-chlorid-Lösung entsteht eine rotviolette Färbung.

Fluoreszenzreaktion mit Resorcin (2 AB DDR): 50 mg Substanz werden mit 10 Tropfen konz. Wasserstoffperoxid-Lösung und tropfenweise mit 1,0 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Mischung wird unter Schütteln erhitzt, bis weiße Nebel ent-

---

44) H. Auterhoff, K.-A. Kovar: Identifizierung von Arzneistoffen. 3. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart 1977. S. 31.

45) Ph. Eur. - Kommentar, S. 113.

46) DAB 7 - Kommentar, S. 1300.

stehen, und mit 50 mg Resorcin versetzt. Nach dem Erkalten wird 1 Tropfen der Mischung zu 10,0 ml 3 N-Ammoniaklösung gegeben. Die Mischung zeigt eine gelbe Färbung und eine grüne Fluoreszenz.

Guanethidin

Sakaguchi-Reaktion: Zu einer Lösung von 1 mg Substanz in 5 ml Wasser gibt man 1 ml 10 proz. Natronlauge und 1 ml 0,05 proz. Lösung von 1-Naphthol in 60 proz. Ethanol. Zu der auf 15 °C abgekühlten Mischung werden 3 Tropfen Natriumhypobromit-Lösung (2 g NaOH in 7,5 ml Wasser werden mit 0,5 ml Brom versetzt und auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt) gegeben. Bei positiver Reaktion tritt eine rotviolette Färbung auf.

Methyldopa

$FeCl_3$-Reaktion: 1 mg Substanz wird in 1 ml 0,1 N-Salzsäure gelöst und mit 2 Tropfen 1 proz. Eisen(III)-chlorid-Lösung versetzt. Es entsteht eine Grünfärbung, die auf Zusatz von Ammoniak nach Purpurrot, auf Zusatz von NaOH nach Rot umschlägt.

Spironolacton

Schwefelsäure-Reaktion: 4 mg Substanz werden in 1 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Es tritt sofort eine gelbgrüne Fluoreszenz auf. Die Lösung wird orangerot und schließlich tiefrot.
Salkowski-Reaktion: Eine Lösung von einigen mg Substanz in 2 bis 3 ml Chloroform wird mit 3 ml konz. Schwefelsäure unterschichtet. Bei positiver Reaktion tritt Rotfärbung auf.

Spironolacton und Polythiazid

Jod-Azid-Reaktion: Zu 2 ml 0,003 N-Jodlösung gibt man einige Tropfen Stärkelösung, 100 mg Natriumazid in Substanz und 50 mg der zu untersuchenden Substanz. Bei positiver Reaktion tritt beim Schütteln Entfärbung oder Aufhellung der blauen Lösung auf.

Trichlormethiazid

50 mg Substanz werden in 3 ml 10 proz. Natronlauge gelöst und zum Sieden erhitzt. In die mit verd. Salpetersäure angesäuerte Lösung werden 3 bis 4 Tropfen 1 proz. Silbernitrat-Lösung gegeben.

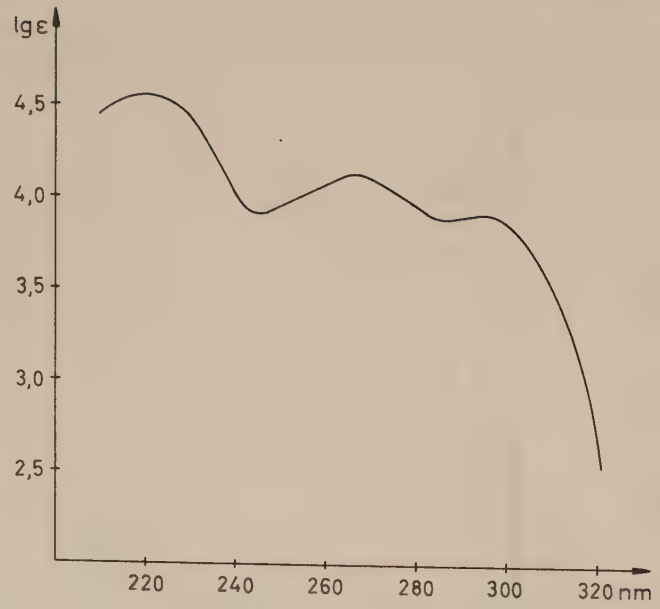


Abb. 40: UV-Spektrum: Reserpin
$C = 5{,}4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

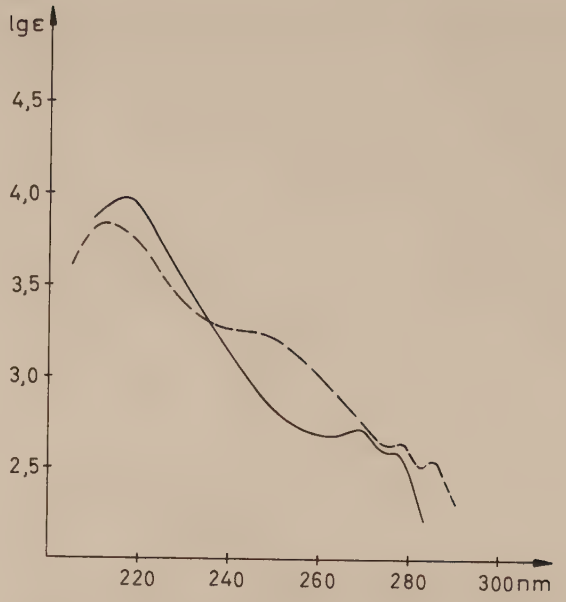


Abb. 41: UV-Spektren

------ Clonidin-Base
$C = 2{,}2 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

——— Clonidin-Hydrochlorid
$C = 1{,}9 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

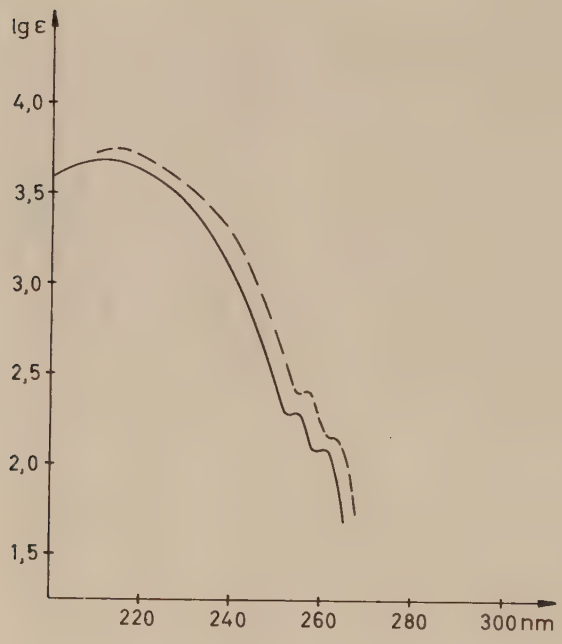


Abb. 42: UV-Spektren

------ Tolazolin-Base $C = 1{,}6 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

——— Tolazolin-Hydrochlorid $C = 4{,}1 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

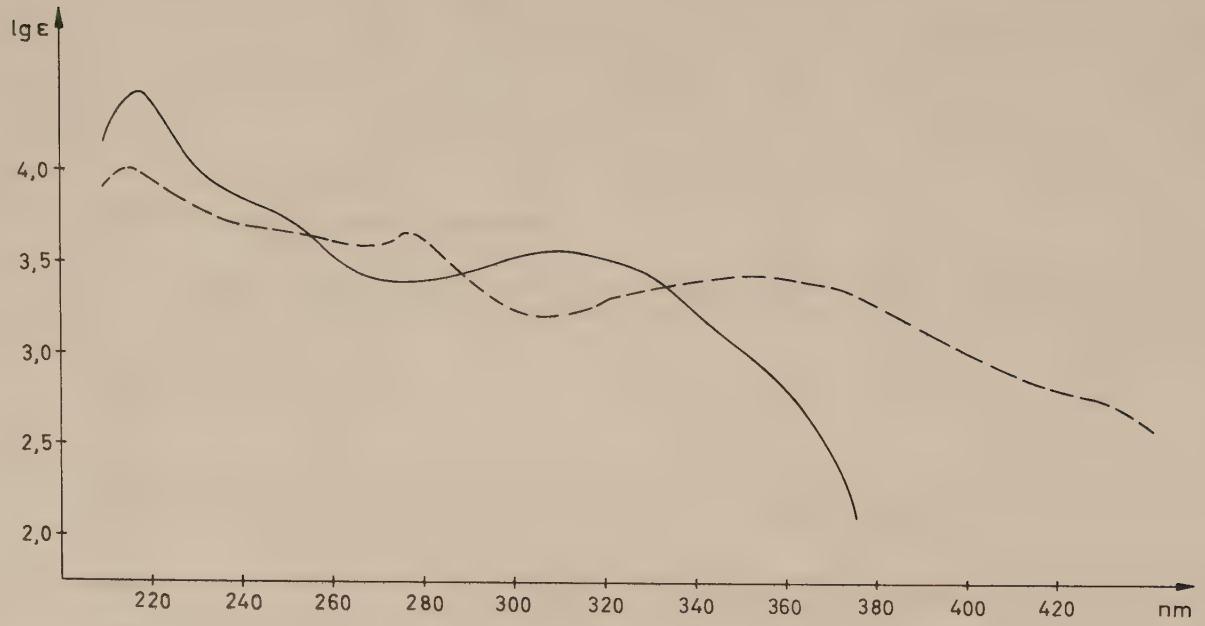


Abb. 43: UV-Spektren

------ Dihydralazin-Base $C = 1{,}0 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

——— Diyhdralazin-Sulfat $C = 8{,}3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

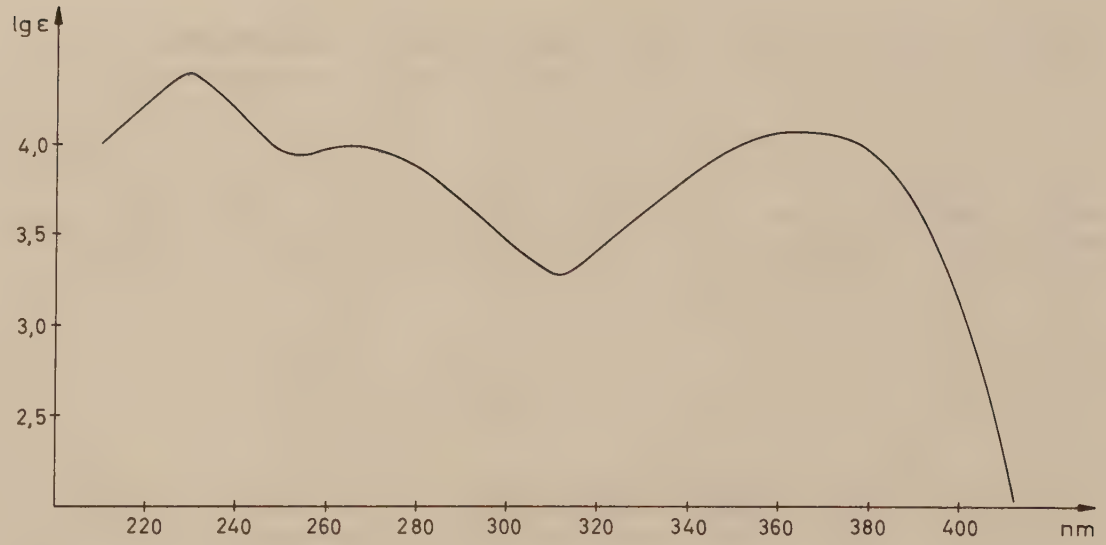


Abb. 44: UV-Spektrum: Triamteren

$C = 5{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

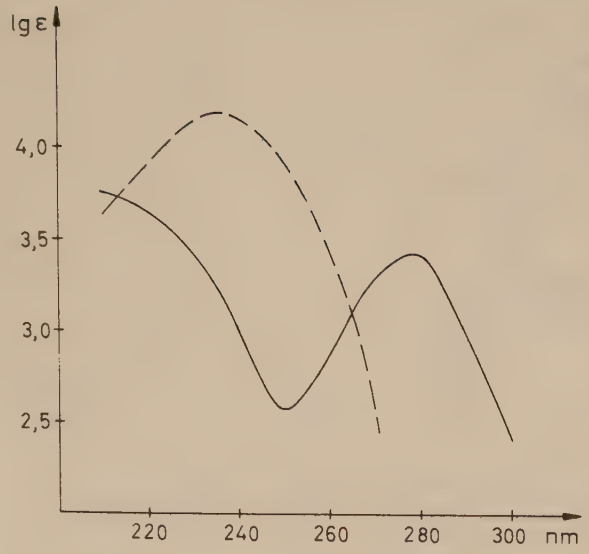


Abb. 45: UV-Spektren

------ Spironolacton $C = 5{,}8 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

——— Methyldopa $C = 3{,}4 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

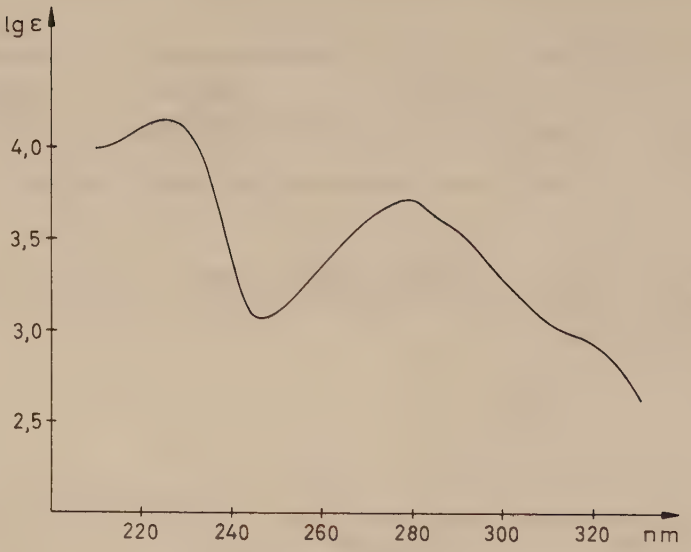


Abb. 46: UV-Spektrum: Chlorothiazid
$C = 4{,}4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

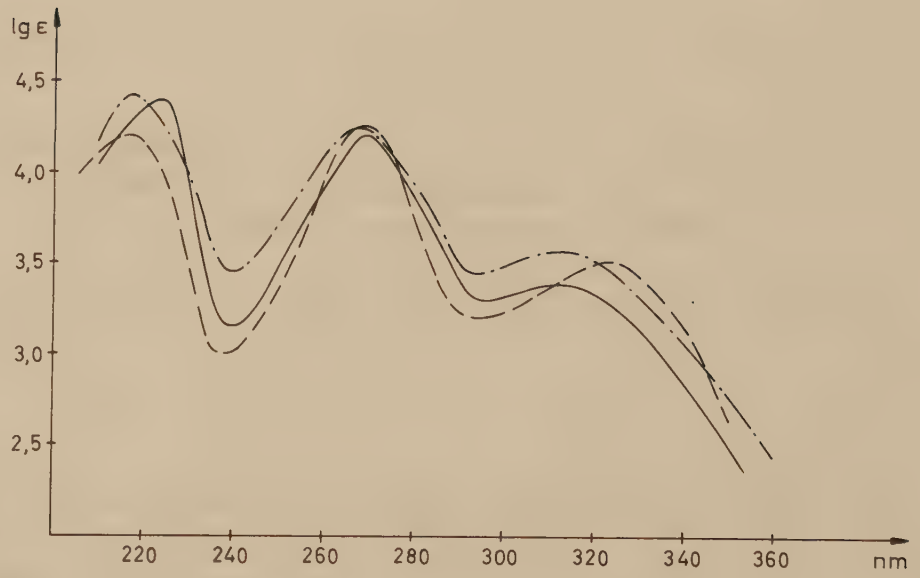


Abb. 47 a: UV-Spektren: Dihydrothiadiazinderivate (Teil I)

—·—·—·— Hydrochlorothiazid $C = 3{,}4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

———————— Buthiazid $C = 7{,}0 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

---------- Bendroflumethiazid $C = 8{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

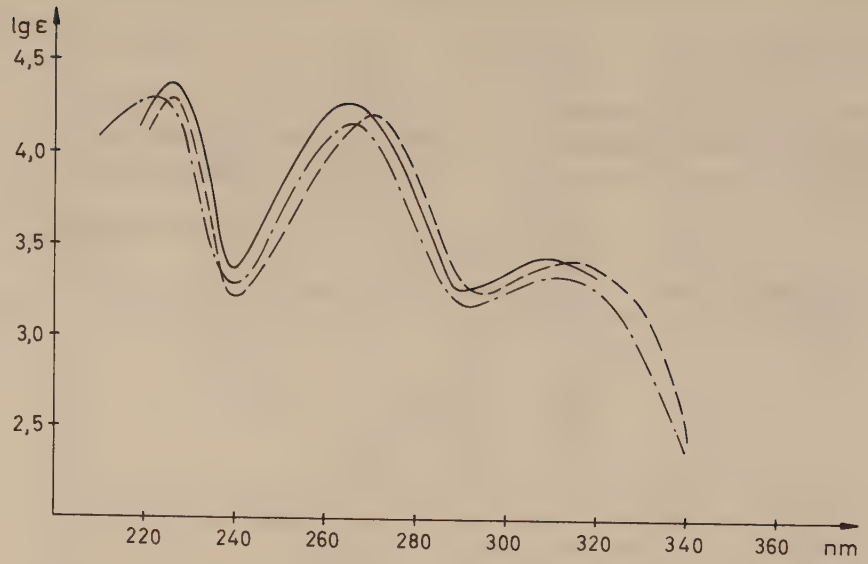


Abb. 47 b: UV-Spektren: Dihydrothiadiazinderivate (Teil II)

————	Trichlormethiazid	$C = 6{,}3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
- - - - - -	Cyclopenthiazid	$C = 7{,}4 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
—·—·—·—	Polythiazid	$C = 1{,}0 \cdot 10^{-4}$ Mol/l

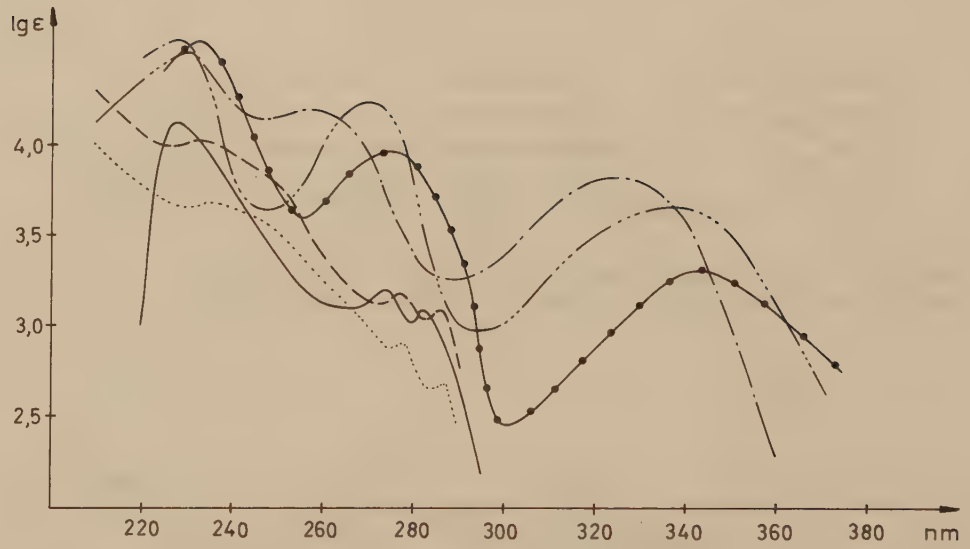


Abb. 48: UV-Spektren: Chlorbenzolsulfonamidderivate

——— Chlortalidon $C = 1{,}3 \cdot 10^{-4}$ Mol/l
–·–·– Xipamid $C = 5{,}3 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
–···– Furosemid $C = 8{,}2 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
—●—●— Quinethazon $C = 3{,}1 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
——— Clopamid $C = 3{,}5 \cdot 10^{-5}$ Mol/l
····· Mefrusid $C = 3{,}1 \cdot 10^{-5}$ Mol/l

IV.3. UV-Spektroskopie (Abb. 40 - 48)

Als Lösungsmittel dient für alle Substanzen mit Ausnahme von Reserpin Methanol. Bei Reserpin wird folgendermaßen vorgegangen: Die für das Spektrum benötigte Menge Substanz wird in 1 ml Chloroform gelöst und die Lösung mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.

V. Trennung von Substanzgemischen nach Stas-Otto

Jeweils 100 mg Substanz werden in 5 ml Wasser aufgenommen, eventuell mit 8 proz. $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert, auf 10 ml mit Wasser aufgefüllt und mit 3 N-Schwefelsäure bis pH 1 angesäuert.
Danach wird dreimal mit 15 ml Ether ausgeschüttelt. Die gesammelten Etherfraktionen werden dreimal mit 5 ml 0,5 N-Natronlauge extrahiert. Die mit 3 N-Schwefelsäure angesäuerten Natronlaugefraktionen werden mit dreimal 15 ml Ether ausgezogen (Fraktion I A).
Der mit Natronlauge ausgezogene Ether stellt Fraktion I B dar.
Die wässrige Ausgangslösung wird mit 8 proz. $NaHCO_3$-Lösung neutralisiert und mit 10 proz. Weinsäure-Lösung auf pH 4 - 5 eingestellt. Dreimal wird mit 15 ml Chloroform ausgeschüttelt (Fraktion II).
Die wässrige Phase wird mit 3 N-Natronlauge auf pH > 10 alkalisiert und dreimal mit 15 ml Ether ausgeschüttelt (Fraktion III).
Nach dem Neutralisieren der wässrigen Phase mit 3 N-Schwefelsäure und dem Einstellen der Lösung mit 6 N-Ammoniaklösung auf pH 9 ergibt dreimaliges Ausschütteln mit 15 ml Chloroform/Isopropanol (3+1) die Fraktion IV.
In der wässrigen Phase bleiben die nichtausschüttelbaren Substanzen zurück (Fraktion V).
Die organischen Lösungsmittel von Fraktion I A bis IV werden über Na_2SO_4 getrocknet und verdampft. Der erhaltene Rückstand wird im Exsikkator getrocknet und gewogen.

Durchführung des Stas-Otto-Gangs mit Substanzgemischen, wie sie in Kombinationspräparaten vorkommen

a) Reserpin enthaltende Substanzgemische

Bei der Einwaage der Einzelkomponenten wird jeweils die Menge zugrundegelegt, wie sie in 10 Einzeldarreichungsformen enthalten ist. So kann Reserpin, das in den Kombinationspräparaten in einer Dosierung von 0,1 mg bis 0,25 mg vorkommt, in Fraktion II (Chloroformlösliche schwache Basen) dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Dazu muß der Chloroformauszug auf 2 bis 3 ml eingeengt werden.
Im übrigen werden der Ausschüttelungsgang und die Bestimmung der in den einzelnen Fraktionen anfallenden Mengen wie oben beschrieben durchgeführt.

Fertigarzneimittel und Zusammensetzung	Fraktion (in Klammern Anfall in Gewichtsprozent - Reserpin ist in allen Fällen in II dc nachweisbar)
Adelphan R (0,1 mg Reserpin, 10 mg Dihydralazinsulfat)	Dihydralazin: III (5 in Ether, 16 in Chloroform) IV (40)
Adelphan-Esidrix R (0,1 mg Reserpin, 10 mg Dihydralazinsulfat, 10 mg Hydrochlorothiazid)	Dihydralazin: III (8 in Ether, 15 in Chloroform) IV (35) Hydrochlorothiazid: I A (10)
Caprinol R (0,1 mg Reserpin, 125 mg Methyldopa, 10 mg Mefrusid)	Mefrusid: I A (66) Methyldopa: nicht ausschüttelbar
Darebon R (0,25 mg Reserpin, 50 mg Chlortalidon)	Chlortalidon: I A (2)
Drenusil R R (0,25 mg Reserpin, 1 mg Polythiazid)	Polythiazid: I A (dc nachweisbar)
Durotan R (0,1 mg Reserpin, 4 mg Xipamid)	Xipamid: I A (52)
Terbolan R (0,1 mg Reserpin, 15 mg Furosemid)	Furosemid: I A (41)

Fertigarzneimittel und Zusammensetzung	Fraktion (in Klammern Anfall in Gewichtsprozent - Reserpin ist in allen Fällen in II dc nachweisbar)
Nortensin R (0,4 mg Reserpin, 60 mg Furosemid)	Furosemid: I A (25)
Repicin R (0,1 mg Reserpin, 2 mg Bendroflumethiazid)	Bendroflumethiazid: I A (45)
Resaltex R und Calmoserpin R (eingesetzt wurde die Menge von 2 Tabletten) (0,125 mg Reserpin, 25 mg Hydrochlorothiazid, 500 mg Triamteren)	Hydrochlorothiazid: I A (12) Triamteren: I A (1) II (3) III (2) IV (3)

b) Substanzgemische ohne Reserpin

Mit Ausnahme von Sali-Presinol R und Sembrina-Saltucin R, wo wegen der hohen Dosierung von Methyldopa nur 2 Tabletten als Grundlage für die Einwaage genommen werden können, wird von 10 Einzeldarreichungsformen ausgegangen.

Fertigarzneimittel und Zusammensetzung	Fraktion (in Klammern Anfall in Gewichtsprozent)
Aldactone 50 - Saltucin R (50 mg Spironolacton, 5 mg Buthiazid)	Spironolacton: I B (93) II (7) Buthiazid: I A (35)
Combipresan R (0,075 mg Clonidinhydrochlorid, 15 mg Chlortalidon)	Clonidin: III (dc nachweisbar) Chlortalidon: I A (10)
Esimil R (10 mg Guanethidinsulfat, 25 mg Hydrochlorothiazid)	Guanethidin: III (34 in Ether, 62 in Chloroform) Hydrochlorothiazid: I A (20)
Sali-Presinol R (250 mg Methyldopa, 10 mg Mefrusid)	Mefrusid: I A (70) Methyldopa: nicht ausschüttelbar
Sembrina-Saltucin R (250 mg Methyldopa, 1 mg Buthiazid)	Buthiazid: I A (dc nachweisbar) Methyldopa: nicht ausschüttelbar

VI.1.a) Oxidation von Methyldopa bzw. Methyldopa-methylester und dünnschichtchromatographische Untersuchung

100 mg Methyldopa (bzw. Methylester) werden in 10 ml Phosphatpuffer pH 8 (0,5 g KH_2PO_4 und 22,6 g Na_2HPO_4 auf 1 l H_2O) mit 1 g $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 ml Phosphatpuffer pH 8 versetzt. Die tief rotgefärbte Lösung wird dünnschichtchromatographisch untersucht.

Herstellung des Methyldopa-methylesters

Nach BRENNER und HUBER [47] tropft man zu 60 ml Methanol bei -20 °C unter Rühren 15 ml Thionylchlorid so, daß die Temperatur nicht über 5 °C ansteigt. In das Gemisch gibt man 3 g Methyldopa, läßt 2 Std. bei Raumtemperatur stehen und kocht 1 Std. unter Rückfluß. Nach Abdampfen im Vakuumrotationsverdampfer gibt man zum öligen Rückstand 20 ml Methanol. Aus der methanolischen Lösung läßt sich der Methylester mit Petrolether ausfällen. Getrocknet wird im Vakuum über P_2O_5 und NaOH. Der Methylester hat eine klebrige Konsistenz und ist hygroskopisch.

Schmelzpunkt: 51 °C
Ausbeute: 2,6 g ≙ 81 % der Theorie

VI.1.c) Elektronenspektroskopische Untersuchung von Methyldopachrom-methylester

100 mg Methyldopa-methylester in 10 ml Phosphatpuffer pH 8 werden mit 0,5 g $K_3[Fe(CN)_6]$ in 10 ml Phosphatpuffer pH 8 versetzt. Die rotgefärbte Lösung wird dreimal mit 20 ml Butanol ausgeschüttelt. Dabei geht ein Teil des gebildeten Methyldopachrom-methylester in das Butanol über. Die vereinigten Butanolextrakte werden kurz über Natriumsulfat getrocknet und zur UV-Messung entsprechend verdünnt. Als Referenzlösung dient Butanol.

---

47) M. Brenner, W. Huber, Helv. Chim. Acta 36, 1109 (1953).

UV-Spektroskopische Messung von Adrenochrom

100 mg Adrenalin und 100 mg Borsäure werden in 10 ml Wasser gelöst. Nach Zusatz von 100 mg $NaNO_2$ wird die Lösung 3 bis 5 Min. auf dem Wasserbad erhitzt, bis sie eine dunkelrote Färbung angenommen hat. Die Farblösung wird daraufhin dreimal mit 10 ml Butanol versetzt und kräftig geschüttelt. Die butanolische Phase, in die ein Teil des Adrenochroms geht, wird jeweils abgetrennt. Die vereinigten Butanolextrakte werden kurz über Natriumsulfat getrocknet und zur UV-Messung entsprechend verdünnt. Es wird gegen Butanol als Referenzlösung gemessen.

VI.1.d) Reduktion und Acetylierung des Farbproduktes

Zu einer gut gerührten Lösung von 0,5 g Methyldopa-methylester in 150 ml Phosphatpuffer pH 8 (0,5 g KH_2PO_4 und 22,6 g Na_2HPO_4 auf 1 l Wasser) gießt man eine Lösung von 4 g $K_3[Fe(CN)_6]$ in 100 ml Pufferlösung. Praktisch momentan tritt eine charakteristische Rotfärbung ein. Nach 5 Sekunden werden eine frisch bereitete Lösung von 2,75 g Natriumdithionit in 50 ml Puffer und nach eingetretener Entfärbung nach hellgelb 5 ml konz. HCl-Lösung zugegeben. Das Gemisch wird im Rotationsverdampfer abgedampft. Den Rückstand versetzt man mit 25 ml Acetanhydrid und 25 ml Pyridin. Der Bodenbelag wird durch Aufkratzen mit einem Spatel in der Flüssigkeit verteilt. Nach 4 Std. wird filtriert, der Salzrückstand mit Methylenchlorid gewaschen und die vereinigte Lösung im Rotationsverdampfer abgedampft. Den Rückstand nimmt man in je 50 ml 0,5 N-HCl und Methylenchlorid auf, wäscht den Methylenchloridextrakt mit Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser neutral und dampft im Rotationsverdampfer ein.

Der Rückstand wird mit Methylenchlorid/Methanol (95+5) an einer Säule von 120 g Kieselgel 60 'Merck' (0,063 - 0,200 mm) chromatographiert. Es werden Fraktionen von 5 bis 10 ml ge-

sammelt und dünnschichtchromatographisch auf Einheitlichkeit geprüft. Nach einem Vorlauf von 220 ml erscheint die Substanz Rf = 0,75 im Eluat. Nach weiteren 120 ml ist das Hauptprodukt Rf = 0,60 in einem Gesamteluat von 60 ml enthalten. Nach dem Abdampfen des Elutionsmittels kristallisiert die Substanz beim Bespritzen mit Ether aus. Umkristallisiert wird aus heißgesättigter etherischer Lösung.

Schmelzpunkt nach Trocknen über P_2O_5: 110 °C
Ausbeute: 0,14 g (20,5 % der Theorie)

$C_{15}H_{17}NO_6$ (307,2)

Gef.:	C 58,69	H 5,57	N 4,60	O 31,27
Ber.:	C 58,63	H 5,53	N 4,56	O 31,27

VI. 1.e) Darstellung des Methyldopachrom-methylester-monosemicarbazon

200 mg Methyldopa-methylester in 20 ml Phosphatpufferlösung pH 8 werden mit 1 g $K_3[Fe(CN)_6]$ in 20 ml Phosphatpufferlösung versetzt. Nach sofort eintretender Rotfärbung wird dreimal mit 20 ml Butanol ausgeschüttelt. Die vereinigten Extrakte werden kurz über Natriumsulfat getrocknet. Im Vakuumrotationsverdampfer wird auf etwa 3 ml eingeengt. Dazu gibt man eine heiße alkoholische Lösung von Semicarbazidacetat [48], die wie folgt hergestellt wird: Eine Verreibung von 1 g Semicarbazidhydrochlorid mit 1 g wasserfreiem Natriumacetat werden mit 10 ml absolutem Ethanol aufgekocht. Das Gemisch wird heiß filtriert.

Der Reaktionsansatz aus dem Butanolextrakt und der Semicarbazidacetat-Lösung werden etwa 1 Std. auf dem Wasserbad erwärmt. Da sich keine Kristalle bilden, muß das dünnschichtchromatographisch nachweisbare gelbe Semicarbazonprodukt (Rf = 0,55; Fließmittel: Chloroform/Methanol 80+20)

---

48) Organikum. 12. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974. S. 426.

säulenchromatographisch getrennt werden. Hierzu wird die Reaktionslösung auf etwa 2 bis 3 ml im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt und auf eine Säule von 100 g Kieselgel 60 'Merck' (0,063 - 0,200 mm) gegeben. Eluiert wird mit Chloroform/Methanol (80+20). Nach einem Vorlauf von 100 ml erscheint das gelb-orange Produkt im Eluat. Nach Verdampfen des Elutionsmittels im Vakuumrotationsverdampfer wird der Rückstand in möglichst wenig heißem Ethanol aufgenommen. Bei 12-stündigem Stehen im Kühlschrank bilden sich große tiefrote, kubische Kristalle.

Schmelzpunkt: 120 °C
Ausbeute: 18 mg ≙ 7,5 % der Theorie

$C_{12}H_{14}N_4O_4$ (278,1)

Gef.:	C 50,72	H 5,90	N 19,26	O 23,84
Ber.:	C 51,79	H 5,03	N 20,14	O 23,02

VI.1.f) Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin

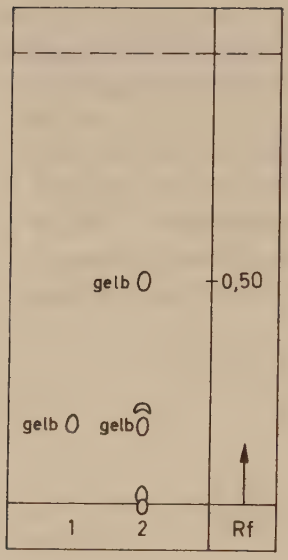
200 mg Methyldopa-methylester werden, wie bei der Darstellung des Monosemicarbazon beschrieben, mit $K_3[Fe(CN)_6]$ oxidiert und danach die Reaktionslösung mit dreimal 20 ml Butanol extrahiert. Die Extrakte werden vereinigt, auf etwa 3 ml im Vakuumrotationsverdampfer eingeengt. Dazu wird die frisch hergestellte Dinitrophenylhydrazin-Lösung gegeben.

Die Dinitrophenylhydrazin-Lösung wird wie folgt hergestellt[49]: Zu 0,4 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin gibt man 2 ml konz. Schwefelsäure und anschließend unter Rühren tropfenweise 3 ml Wasser. Der warmen Lösung setzt man 10 ml 95 proz. Ethanol zu.

Wie das Dünnschichtchromatogramm der Reaktionslösung nach 24 Std. (Abb. 49) zeigt, entsteht ein gelbgefärbtes Produkt, bei dem es sich um ein Dinitrophenylhydrazon handeln könnte.

---

49) Organikum. 12. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974. S. 426.



1 = 2,4-Dinitrophenylhydrazin
2 = Reaktionslösung mit Dinitrophenylhydrazin nach 12 Std.

Adsorbens: Kieselgel F_{254} 'Merck'
Fließmittel: Chloroform
Laufhöhe: 10 cm

Abb. 49: Dünnschichtchromatogramm der Reaktionslösung mit Dinitrophenylhydrazin

VI. 1. g) Umsetzung mit o-Phenylendiamin

200 mg Methyldopa-methylester werden, wie bei der Darstellung des Monosemicarbazon beschrieben, mit 1 g $K_3[Fe(CN)_6]$ oxidiert. Die tiefrot gefärbte Reaktionslösung wird mit dreimal 20 ml Butanol ausgeschüttelt. Die Extrakte werden vereinigt und im Vakuumrotationsverdampfer auf etwa 5 ml eingeengt. Dieser Farbstofflösung werden 100 mg o-Phenylendiamin zugegeben. Das Reaktionsgemisch wird 2 Std. unter Rückfluß erhitzt.

Im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 19) ist bei Rf = 0,60 ein gelber Fleck zu erkennen, der unter UV-Licht grün fluoresziert. Diese Substanz kann mit präparativer Schichtchromatographie isoliert werden. Hierzu wird die Reaktionslösung im Vakuum zur Trockne eingeengt und in möglichst wenig

Methanol aufgenommen. Das Chromatogramm wird in Chloroform/Methanol (90+10) entwickelt. Die Kieselgelschicht im gelbgefärbten Bereich bei Rf = 0,60 wird ausgekratzt und das Kieselgel mit dreimal 20 ml Methanol eluiert. Die vereinigten gelben, fluoreszierenden Eluate werden zweimal durch ein Blauband-Filter gegeben und zur Trockne eingeengt. Eine dünnschichtchromatographische Prüfung des Rückstandes ergibt 3 Flecke, die auch nach erneuter chromatographischer Reinigung auftreten. (Für weitere Reinigungen war die Substanzmenge zu gering.) Der Rückstand ist amorph, von klebriger Konsistenz und besitzt eine orange Färbung.

Ausbeute: 2 bis 3 mg

VI.2. Umsetzung von Methyldopa mit salpetriger Säure

10 mg Methyldopa werden in 10 ml 0,5 N-HCl gelöst. Nach Zugabe von 0,2 ml einer 10 proz. $NaNO_2$-Lösung setzt sofort Gasentwicklung ein, und eine Gelbfärbung des Reaktionsansatzes entsteht. Gibt man 40 proz. NaOH-Lösung bis zur alkalischen Reaktion zu, schlägt die Farbe um nach Rot, das bald in ein Rotbraun übergeht.

Darstellung des Triacetylderivates des gelben Farbprodukts

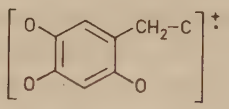
200 mg Methyldopa-methylester werden in 100 ml 0,5 N-HCl gelöst. Nach Zugabe von 2 ml einer 10 proz. $NaNO_2$-Lösung unter Rühren tritt sofort Gasentwicklung auf, und der Reaktionsansatz färbt sich gelb. Hat die Gasentwicklung der Lösung nachgelassen, wird im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeengt. Zum Rückstand werden 20 ml Acetanhydrid und 20 ml Pyridin gegeben. Unter Rühren wird 4 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der Ansatz wird filtriert, und der Filterrückstand mit 20 ml Methylenchlorid gewaschen. Die vereinigten Filtrate werden gesammelt und zur Trockne eingedampft, der Rückstand wird mit 20 ml Methylenchlorid und 20 ml 0,5 N-HCl versetzt. Die Methylenchloridphase wird abgetrennt und mit Natriumhydrogencar-

bonat-Lösung und Wasser neutral gewaschen. Der Rückstand wird dünnschichtchromatographisch untersucht. Die gelbe Substanz (Rf = 0,60; Fließmittel: Chloroform/Methanol 90+10) wird mit präparativer Schichtchromatographie abgetrennt und isoliert. Hierzu wird der Rückstand in Methanol gelöst und auf die Kieselgelplatte entlang der Startlinie aufgetragen. Das Chromatogramm wird in Chloroform/Methanol (90+10) entwickelt. Der gelbe Kieselgelbereich bei Rf = 0,60 wird von der Platte abgetragen und mit Methanol eluiert. Nach zweimaligem Filtrieren durch ein Blauband-Filter wird das Filtrat im Vakuumrotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

Schmelzpunkt: 48 °C

Ausbeute: 5 mg ≙ 2 % der Theorie

Die massenspektroskopische Untersuchung (Abb. 50) der gelben Substanz ergibt ein Molekulargewicht von 397. Der 100-Prozent-Peak von 148 dürfte von folgendem Fragmention herrühren:



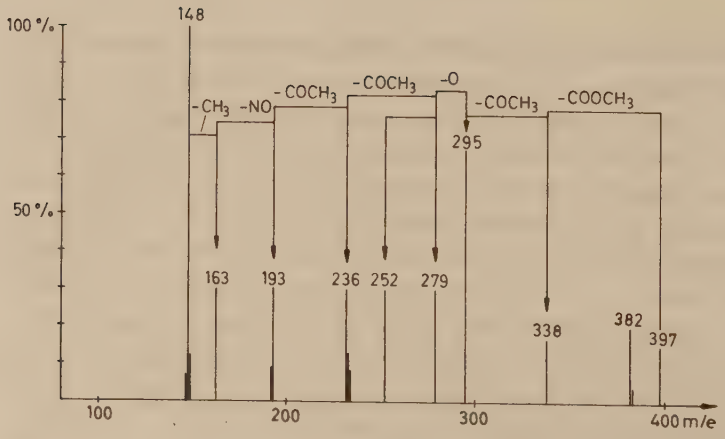


Abb. 50: Massenspektrum des acetylierten gelben Farbprodukts (Einlaßtemperatur: 90 °C)

VI. 3. Reaktion mit Nitrobenzoylchlorid

Etwa 5 mg Methyldopa werden in 1 ml Wasser und 1 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von etwa 5 mg Nitrobenzoylchlorid zum Sieden erhitzt. Unter Schütteln werden dem Gemisch 0,2 ml einer 10proz. Natriumcarbonat-Lösung zugegeben, wobei eine gelbe bis gelbbraune Färbung auftritt.

Durchführung der Reaktion mit Brenzkatechin

Etwa 5 mg Brenzkatechin werden in 1 ml Wasser und 1 ml Pyridin gelöst und nach Zusatz von etwa 5 mg Nitrobenzoylchlorid zum Sieden erhitzt. Dem Gemisch werden 0,2 ml einer 10 proz. Natriumcarbonat-Lösung zugegeben. Dabei tritt dieselbe gelbbraune Färbung wie bei der Durchführung der Reaktion mit Methyldopa beim Schütteln auf.

UV-Spektroskopischer Vergleich (Abb. 51)

Die Reaktionsansätze von Methyldopa und von Brenzkatechin mit Nitrobenzoylchlorid werden 1 : 20 mit Wasser verdünnt und sofort zur Messung gebracht.

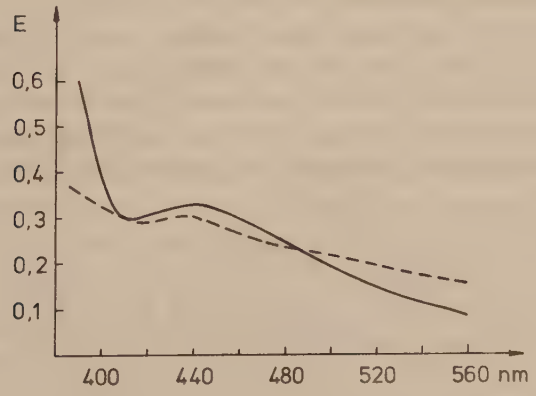


Abb. 51: UV-Spektroskopischer Vergleich der Reaktionslösungen von Methyldopa (= ———) und Brenzkatechin (= -----) nach Umsetzung mit Nitrobenzoylchlorid in Pyridin/Wasser und nach Zusatz von Na_2CO_3-Lösung

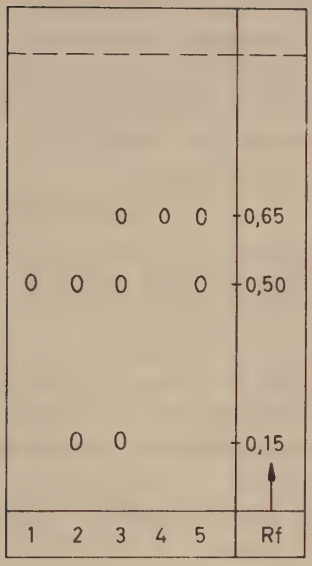
VII. 1. Gelbfärbung von Chlortalidon in konz. Schwefelsäure, UV-spektroskopische Untersuchung

Gibt man zu 10 bis 20 mg Chlortalidon etwa 1 ml konz. Schwefelsäure (95-97 proz., zur Analyse 'Merck'), so tritt augenblicklich eine intensive Gelbfärbung auf.

Zur elektronenspektroskopischen Untersuchung (Abb. 24) werden 24 mg Chlortalidon in 10 ml konz. Schwefelsäure gelöst und 1 : 10 verdünnt. Die $7{,}1 \times 10^{-5}$ molare Lösung wird sofort zur Messung gebracht. Nach 12 Stunden wird die Messung wiederholt. Beide Kurven sind in ihren Maxima identisch: 238 nm (3.81), 350 nm (3.90) und 388 nm (3.82). Nimmt man ein Elektronenspektrum der Lösung nach 3-stündigem Erhitzen bei 80 °C auf, so stellt sich ein neues Maximum bei 300 nm (3.87) ein.

VII. 1. a) Dünnschichtchromatographische Untersuchung der gelben Lösung

Je 100 mg Chlortalidon werden in jeweils 5 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Je ein Ansatz wird sofort, nach 20 Minuten, nach 3-, 12- und 36-stündigem Stehenlassen bei Raumtemperatur auf jeweils 20 g Eis gegossen. Ein Ansatz wird 3 Stunden auf 80 °C erhitzt und dann auf 20 g Eis gegeben. In einen anderen Ansatz wird tropfenweise Wasser gegeben, bis sich ein Niederschlag bildet. Die jeweils ausfallenden Substanzen werden in Chloroform gelöst und dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb. 25). Löst man den durch die verdünnte Schwefelsäure noch feuchten Niederschlag in Methanol, so tritt auf dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 52) ein neuer Fleck mit Rf = 0,65 auf. Daß es sich hierbei um den Methylether des Chlortalidon handelt, läßt der identische Rf-Wert mit dem des als Referenz aufgetragenen Methylether des Chlortalidon erkennen.



1 = Chlortalidon
2 = Niederschlag, in Chloroform gelöst
3 = Niederschlag, in Methanol gelöst
4 = Methylether des Chlortalidon
5 = Reaktionslösung: Chlortalidon, verdünnte Schwefelsäure, Methanol

Adsorbens: Kieselgel F_{254} 'Merck'

Fließmittel: Chloroform/Methanol (70+30)

Detektion:
1. UV-Licht
2. Besprühen mit konz. Schwefelsäure: Flekke Rf = 0,50 und 0,65 färben sich gelb
3. Besprühen mit α-Naphthol in konz. Schwefelsäure: Fleck Rf = 0,15 färbt sich violett

Abb. 52: Dünnschichtchromatogramm des in Methanol gelösten Produkts, das aus der erhitzten Chlortalidon-Schwefelsäure-Lösung beim Auf-das-Eis-Gießen ausfällt

Eine Lösung von 0,2 g Chlortalidon in 5 ml Methanol und 0,5 ml 3 N-H_2SO_4, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen, zeigt im Dünnschichtchromatogramm ebenfalls einen Fleck bei Rf = 0,65.

Die Substanz mit dem Rf-Wert = 0,65 läßt sich aus der methanolischen Lösung des ausgefallenen Niederschlags durch präparative Schichtchromatographie (Chloroform/Methanol 70+30) isolieren. Die Schicht mit dem Rf = 0,65 wird von der Platte abgekratzt, mit Methanol eluiert, das Eluat über Blauband-Filter gegeben und im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wird aus Methanol umkristallisiert. Die weiße Substanz hat einen Schmelzpunkt von 121 °C (Zers.). Das Massenspektrum dieser Substanz zeigt Molekülpeaks bei

m/e 352, 353, 354, deren Intensitäten der Isotopenverteilung chlor- und schwefelhaltiger Verbindungen entsprechen, was für ein Molekulargewicht von 352 spricht. Die Fragmentpeaks bei m/e 321, 322, 323 zeigen die Abspaltung von OCH_3. Diese und die übrigen Peaks stimmen mit denen des Massenspektrums von Chlortalidon (Abb. 32) überein.

$C_{15}\ H_{13}\ Cl\ N_2\ O_4\ S$ (352,4)

Gef.:	C	51,11	H	3,62	Cl	9,94	N	7,97	O 18,24	S 9,12
Ber.:	C	51,06	H	3,68	Cl	10,06	N	7,94	O 18,16	S 9,08

Darstellung des Chlortalidon-methylether

Nach der Vorschrift von W. GRAF und Mitarbeiter [50] werden 1 g Chlortalidon in 50 ml Methanol und 1 ml konz. Salzsäure gelöst und 2 Stunden unter Rückfluß erhitzt. Dann destilliert man das Methanol ab, zuletzt im Vakuum. Der Rückstand wird aus Methanol mehrmals umkristallisiert.

Schmelzpunkt: 123 °C (Zers.)
Ausbeute: 0,11 g ≙ 10,6 % der Theorie

VII. 1. b) Isolierung des Benzophenoncarbonsäurederivates

Methode A:

0,5 g Chlortalidon werden in 5 ml konz. Schwefelsäure auf 80 °C erhitzt. Die abgekühlte Reaktionslösung wird auf 20 g Eis gegossen. Der dabei entstehende Niederschlag wird abfiltriert und in Aceton gelöst. Das Filtrat wird dreimal mit 20 ml Chloroform extrahiert. Die eingeengten Lösungen werden auf präparative Schichtplatten (Kieselgel F_{254} 'Merck') aufgetragen. Nach dem Entwickeln in Chloroform/Methanol (70+30) wird die Schicht bei Rf = 0,15 ausgekratzt und mit Aceton eluiert. Das Eluat wird durch Blauband-Fil-

---

50) W. Graf, E. Girod, E. Schmid, W.G. Stoll, Helv. Chim. Acta 42, 1099 (1959).

ter gegeben und zur Trockne eingeengt. Umkristallisiert wird aus Methanol/Wasser.

Schmelzpunkt nach Trocknen über P_2O_5: 223 °C (Zers.)
Ausbeute: 75 mg ≙ 15 % der Theorie

Methode B:

0,5 g Chlortalidon werden wie bei Methode A in konz. Schwefelsäure erhitzt. Die Reaktionslösung wird auf 80 g Eis gegossen, der dabei entstehende Niederschlag abfiltriert. Im Filtrat kristallisiert innerhalb von 12 Stunden in sternförmigen Kristallen eine weiße Substanz aus. Diese wird abfiltriert und aus Methanol/Wasser umkristallisiert, bis sie dünnschichtchromatographisch rein ist.

Schmelzpunkt nach Trocknen über P_2O_5: 221 °C (Zers.)
Ausbeute: 60 mg ≙ 13 % der Theorie

Darstellung des Chlortalidon-benzophenoncarbonsäure-derivates durch alkalische Hydrolyse

Nach W. GRAF und Mitarbeiter [51] wird 1 g Chlortalidon in 5 ml 2 N-Natronlauge 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. Die Lösung wird heiß über Kohle filtriert und mit 10 proz. Salzsäure angesäuert. Die ausgefallene Substanz wird mehrmals in Methanol/Wasser bis zur dünnschichtchromatographischen Reinheit umkristallisiert.

Schmelzpunkt nach Trocknen über P_2O_5: 221 °C (Zers.)
Ausbeute: 0,36 g ≙ 36 % der Theorie

Die nach den Methoden A und B und durch alkalische Hydrolyse erhaltenen Substanzen sind dünnschichtchromatographisch identisch.

---

51) W. Graf, E. Girod, E. Schmid, W.G. Stoll, Helv. Chim. Acta 42, 1097 (1959).

$C_{14}H_{10}ClNO_5S$ (339,6)

Gef.:	C 49,51	H 2,94	Cl 10,42	N 4,12	O 23,50	S 9,40
Ber.:	C 49,96	H 3,15	Cl 10,53	N 4,34	O 23,12	S 9,18

VII. 2. Violettfärbung des Benzophenoncarbonsäurederivates mit α-Naphthol in konz. Schwefelsäure

10 mg Benzophenoncarbonsäurederivat des Chlortalidon werden in 1 ml konz. Schwefelsäure unter leichter Gelbfärbung gelöst. Gibt man zu dieser Lösung 5 mg α-Naphthol, so entsteht sofort eine tiefe Rotviolettfärbung.

VII. 2. a) UV-Spektroskopische Untersuchung des Reaktionsansatzes

20 mg des Benzophenoncarbonsäurederivates werden zusammen mit 40 mg α-Naphthol in 100 ml konz. Schwefelsäure gelöst. Die rotviolette Lösung wird mit Schwefelsäure 1 : 10 zu einer $5{,}9 \times 10^{-5}$ molaren (bezogen auf das Benzophenoncarbonsäurederivat) Lösung verdünnt und zur Messung gebracht (Abb. 33). Die Maxima sind bei 318 nm (4.52) und 510 nm (3.94), eine Schulter bei 375 nm.

VII. 2. b) Isolierung eines Produkts aus der Farbstofflösung

0,2 g des Benzophenoncarbonsäurederivates des Chlortalidon in 5 ml konz. Schwefelsäure werden mit der äquimolaren Menge von α-Naphthol (85 mg) versetzt. Die tief rotviolett gefärbte Lösung wird 20 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Dann rührt man die Säurelösung tropfenweise in 100 ml eisgekühlten Ether ein. Dabei verschwindet die blauviolette Farbe und der Ether färbt sich gelblich. Am Boden des Reaktionsgefäßes scheiden sich gelbbraun gefärbte Tropfen ab. Der Ether wird in einen Schütteltrichter überführt, mit Wasser und $NaHCO_3$-Lösung neutral ge-

waschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum abdestilliert.

Eine möglichst konzentrierte etherische Lösung des Rückstandes wird auf eine präparative Kieselgelplatte bandförmig aufgetragen. Das Chromatogramm wird in Chloroform/Methanol (80+20) entwickelt, und die Zone bei Rf = 0,50, die sich mit konz. Schwefelsäure violett anfärbt, ausgekratzt. Das Kieselgel wird mit viermal 20 ml Ether eluiert, das Eluat durch Blauband-Filter gegeben und im Vakuum zur Trockne eingeengt.

Schmelzpunkt nach Trocknen über P_2O_5: 195 °C
Ausbeute: 20 mg ≙ 7,8 % der Theorie

$C_{24}H_{16}ClNO_5S$ (465,5)

Gef.:	C	61,11	H	3,59	Cl	7,50	N	2,93	O 17,76	S 6,97
Ber.:	C	61,39	H	3,44	Cl	7,63	N	3,01	O 17,20	S 6,88

VII. 2. d) Zur Spezifität der Reaktion (Tab. 10)

Jeweils etwa 20 mg der zu untersuchenden Substanzen werden mit 1 ml konz. Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird erhitzt, bis erste Nebeldämpfe entstehen. In die abgekühlte Reaktionslösung gibt man etwa 10 mg α-Naphthol.

VIII. Zur Analytik von Clonidin

Umsetzungsversuche mit 4-Dimethylaminobenzaldehyd

Etwa 50 mg Clonidinhydrochlorid werden in 2 ml Wasser gelöst und mit 2 ml Ehrlich-Reagens (2,0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd / 90 ml 6 N-HCl / 10 ml Wasser) versetzt. Auch nach längerem Erhitzen bis zum Sieden tritt lediglich eine leichte Gelbfärbung auf.

Versetzt man etwa 50 mg Clonidinhydrochlorid mit einer 10 proz. Lösung von 4-Dimethylaminobenzaldehyd in konz. H_2SO_4, so stellt sich keine charakteristische Färbung ein. Die beim Erhitzen auftretende Braunfärbung ist auch durch Erhitzen von 4-Dimethylaminobenzaldehyd in konz. H_2SO_4 erreichbar.

Oxidations- und Kupplungsversuche mit diazotierter Sulfanilsäure

In äquimolarem Verhältnis werden 200 mg Clonidin mit 200 mg Schwefel in einem Kolben mit Luftkühler im Heizbad erhitzt (etwa 150 °C) [52]. Die Temperatur wird langsam auf 250 °C gesteigert. Nach dem Erkalten wird mit 5 ml 1 N-HCl extrahiert. 1 ml des filtrierten Extrakts wird mit 2 ml 3 N-NaOH versetzt. Man gibt 1 ml einer frisch bereiteten Mischung aus gleichen Teilen Sulfanilsäure-Lösung und 10 proz. $NaNO_2$-Lösung hinzu. Es tritt eine schmutzig braune Färbung auf, die nicht als positiv für eine Kupplungsreaktion angesehen werden kann.

Erhitzen mit konz. NaOH-Lösung bis zur Blaufärbung

50 mg Clonidinhydrochlorid werden mit 2 ml konz. NaOH-Lösung versetzt und zum Sieden erhitzt, bis kein Wasserdampf mehr entweicht. Läßt man nun die Schmelze erkalten, so

---

52) Organikum. 12. Aufl. VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1974. S. 426.

tritt auf der Oberfläche der erstarrten Schmelze eine tiefe Blaufärbung auf. Die erstarrte Schmelze wird aus dem Schmelztiegel gekratzt, zerkleinert und dreimal mit 5 ml Ether extrahiert. Der Etherextrakt enthält neben dem blauen Farbprodukt und zwei weiteren Produkten vor allem Clonidin. Durch präparative Schichtchromatographie (Kieselgel 'Merck') mit Chloroform/Methanol (135+20) als Fließmittel (das Kieselgel wird mit Methanol eluiert) kann aus diesem Substanzgemisch ein lachsfarbener Stoff isoliert werden, der sich durch Zugabe von NaOH-Lösung wieder blau färbt. Dieser Stoff zersetzt sich jedoch rasch, wie eine dünnschichtchromatographische Untersuchung zeigt.

Umsetzung mit Natriumhydrid in Acetonitril

Zu etwa 5 ml Acetonitril, das durch mehrfache Destillation über P_2O_5 getrocknet und gereinigt wird, gibt man 100 mg Natriumhydrid in Form eines 50 proz. paraffinhaltigen Granulates. Diese Mischung wird mit 50 mg Clonidin versetzt und vorsichtig im Ölbad bei etwa 70 °C erwärmt. Eine Färbung tritt hierbei nicht auf, was darauf hinweist, daß die Blaufärbung des Etherextrakts aus der NaOH-Clonidin-Schmelze nicht auf die Deprotonierung eines basischen Stickstoffs zurückzuführen ist.

NaOH-Schmelze und Kupplung mit diazotierter Sulfanilsäure

Erhitzt man die blaugefärbte, erstarrte NaOH-Clonidin-Schmelze über offener Flamme vorsichtig weiter, so geht die Farbe über Violett nach Rot in ein tiefes Rotbraun über. Die erkaltete Schmelze wird mit 5 ml Wasser eluiert. Die filtrierte Lösung wird mit 2 ml einer frisch bereiteten Lösung aus gleichen Teilen Sulfanilsäure-Lösung und 10 proz. $NaNO_2$-Lösung versetzt, wobei eine tiefe Rotfärbung auftritt.

L e b e n s l a u f

Am 29. September 1947 wurde ich, Wolfgang Wessinger, als Sohn des Schriftsetzermeisters Alois Wessinger und seiner Ehefrau Else, geb. Isele, in Bilfingen (Kreis Pforzheim) geboren.

Von 1954 bis 1958 besuchte ich die Volksschule in Bilfingen, von 1958 bis 1966 das Reuchlin-Gymnasium in Pforzheim, wo ich im Oktober 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Von 1966 bis 1971 studierte ich katholische Theologie an den Universitäten von Freiburg i. Brsg. und Innsbruck, im Februar 1972 wurde das Studium mit der Theologischen Diplomprüfung an der Universität Freiburg abgeschlossen. Von 1971 bis 1973 war ich als Lektor im Verlag Katholisches Bibelwerk GmbH, Stuttgart, tätig.

Im Wintersemester 1973/1974 nahm ich das Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen auf und schloß es mit dem Zweiten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung im März 1977 ab. Die praktische Ausbildung machte ich von Mai bis Oktober 1977 in der Marien-Apotheke in Stuttgart und von November 1977 bis April 1978 am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen. Den Dritten Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung legte ich im Mai 1978 in Stuttgart ab, die Approbation als Apotheker erhielt ich im Juni 1978.

Im November 1977 begann ich unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Auterhoff mit der Dissertation "Zur Analytik gebräuchlicher Antihypertonika", die ich im Mai 1979 abschloß.

Im März 1972 heiratete ich die Sozialpädagogin Sibylle Rotta; aus dieser Ehe stammen die beiden Söhne Benjamin (geb. 10.8.1976) und Simon (geb. 5.4.1978).

Meine naturwissenschaftlichen akademischen Lehrer außer Herrn Professor Dr. H. Auterhoff waren die Professoren und Dozenten:

E. Graf, H. Hamacher, K.-A. Kovar (Pharmazie)
E. Reinhard (Pharmazeutische Biologie)
H.P.T. Ammon (Pharmakologie)
E. Müller, W. Rüdorff (Chemie)
R.E. Bader (Hygiene)
H. Krüger (Physik).

Bönecke-Druck 3392-Clausthal-Z. 29